

UNIVERSIDAD DE CUENCA



FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

CENTRO DE POSTGRADO

Maestría en

“REPRODUCCIÓN ANIMAL”

**“EFECTO DE LA APLICACIÓN DE GONADOTROFINA CORIÓNIC
EQUINA (ECG) EN VACAS DONANTES SUPEROVULADAS CON
FOLLTROPIN-V (FSH-P LIOFILIZADA)”.**

Tesis previa a la obtención del
Título de MAGISTER EN
REPRODUCCIÓN ANIMAL.

Autor: Diego Ismael Salinas Montenegro.

Director: Dr. Carlos Jiménez Alvarado. MSc.

CUENCA – ECUADOR

2013

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar la eCG añadida a un tratamiento superovulatorio con la finalidad de incrementar el número de embriones viables y transferibles. Fueron seleccionadas 20 vacas donantes Holstein friesian y divididos en dos grupos de 10: Grupo 1.- Vacas tratadas con (eCG más Folltropin-V), y Grupo 2.- Vacas tratadas con (Folltropin-V). Grupo 1.- el día 0, aplicación intravaginal del dispositivo CIDR; más 3 mg (BE) y (P4) 100mg. IM.; el día 4, se aplicó Folltropin-V (FSH-p) IM cada 12 horas en dosis decrecientes durante cuatro días; el día 6, se aplicó dos veces de PGF2a 2ml IM cada 12 horas; el día 7, se retiró el implante y se aplicó dos dosis de 200 UI de eCG cada 12 horas; El día 8, se inyectó 2,5 ml de (250 ug de Buseralina) y se inseminó 3 veces cada 12 horas. Mientras que el Grupo 2 se procedió de la misma manera, excluyendo la eCG. El día 15, se recolectó los embriones para su evaluación y clasificación. Para el análisis de las variables cuerpos lúteos, total de estructuras colectadas, embriones transferibles se utilizó el Análisis de Varianza y Chi-cuadrado; concluyendo que no hubo significancia estadística alguna ($P > 0.05$) y que la eCG adicionada a folltropin-V no dio la respuesta esperada.

Palabras claves: eCG, superovulación, donantes, FSH-p, embriones.

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the eCG added to superovulatory treatment in order to increase the number of viable embryos and transferable. 20 donors were selected Holstein Friesian cows and divided into two groups of 10: Group 1. - Cows treated (eCG more Folltropin-V), and Group 2. - Cows treated with (Folltropin-V). Group 1. - Day 0 CIDR intravaginal application, plus 3 mg (BE) and (P4) 100mg. IM., The 4th, was applied Folltropin-V (FSH-p) IM every 12 hours in decreasing doses for four days, the 6th, was applied twice 2ml PGF2a IM every 12 hours, on day 7, retired the implant and applied two doses of 200 IU of eCG every 12 hours, the 8th, was injected 2.5 ml (250 ug of Buseralina) and inseminated 3 times every 12 hours. While the Group 2 proceeded in the same way, excluding eCG. On day 15, the embryos were collected for evaluation and classification. For the analysis of the variables corpora lutea, total collected structures, transferable embryos was used Analysis of Variance and Chi-Square, concluding that there was any statistical significance ($P > 0.05$) and that added to Folltropin eCG-V did not the expected response.

Keywords: eCG, superovulation, donors, FSH-P, embryos.

INDICE GENERAL

I	INTRODUCCIÓN	18
	OBJETIVOS:.....	19
	Objetivo General.....	19
	Objetivos específicos.	19
II	REVISIÓN DE LITERATURA	20
	2.1. HISTORIA Y SITUACIÓN ACTUAL DE LA OVULACIÓN MÚLTIPLE Y LA TRASFERENCIA DE EMBRIONES.....	20
	2.1. USO DE LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES.....	24
	2.1.1. Mejoramiento genético.	25
	2.2.2. Bioseguridad.	25
	2.2.3. Uso de otras técnicas reproductivas.....	26
	2.2.4. Transporte de Germoplasma.	26
	2.2.5. Conservación del material genético.....	26
	2.3. SELECCIÓN DE DONADORAS Y RECEPTORAS.	27
	2.3.1. Donadoras.....	27
	2.3.2. Receptora.....	28
	2.4. FISIOLOGÍA REPRODUCTIVA DEL BOVINO.	29
	2.4.1. Control Neurológico del Ciclo Estral.	29
	2.4.2. Ciclo Estral.....	31
	2.4.3. Dinámica Folicular Bovina.....	34
	2.5. MANEJO Y PREPARACIÓN DE LOS ANIMALES DONANTES.....	36
	2.5.1. Sincronización Previa.	37
	2.6. SUPEROVULACIÓN.	38



2.6.1.	Gonadotropinas.	41
2.6.2.	Dosis de FSH.	42
2.6.3.	Gonadotropina Coriónica Equina (eCG).	47
2.7.	TRATAMIENTOS DE SUPEROVULACIÓN.	51
2.7.1.	Protocolo Brasileiro de Superovulación.	54
2.7.2.	Protocolo Combo para Superovulación.	54
2.8.	TECNICA DE COLECCIÓN DE EMBRIONES.	57
2.8.1.	Recuperación de embriones.	59
2.9.	MEDIOS DE COLECCIÓN Y MANTENIMIENTO.	60
2.10.	BÚSQUEDA Y MANIPULACIÓN DE LOS EMBRIONES.	62
2.11.	IDENTIFICACIÓN DE LOS EMBRIONES.	63
2.11.1.	Estadios de desarrollo del embrión.	64
2.12.	CLASIFICACIÓN DE LOS EMBRIONES.	65
2.13.	CONGELACION DE EMBRIONES.	69
2.13.1.	Principios Básicos.	70
2.13.2.	Crioprotectores.	72
2.13.3.	Protocolo tradicional de congelación y descongelación de embriones....	74
2.14.	SINCRONIZACIÓN DE RECEPTORAS.	76
2.14.1.	Resincronización de las Receptoras.	79
2.14.2.	Manejo de receptoras.	80
2.15.	TECNICAS DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES BOVINOS.	81
2.15.1.	TRANSFERENCIA QUIRÚRGICA.	81
2.15.2.	MÉTODO NO QUIRURGICO.	83
III	MATERIALES Y MÉTODOS.	86
3.1.	MATERIALES.	86
3.1.1.	Materiales de campo.	86



3.2.	MÉTODOS:	87
3.2.1.	Localización y duración de la investigación.	87
3.2.2.	Criterios de inclusión:	88
3.2.3.	Criterios de exclusión:	88
3.2.4.	Características de las vacas para la investigación.	89
3.2.5.	Manejo de la dieta de los animales.	89
3.2.6.	Tratamientos en estudio.	89
3.2.7.	Procedimiento Experimental:	92
3.3.	FORMULACIÓN DE HIPÓTESIS O TENTATIVAS.	98
3.4.	VARIABLES E INDICADORES:	98
3.4.1.	Variable Dependiente:	98
3.4.2.	Variable Independiente:	98
3.5.	DISEÑO EXPERIMENTAL	100
IV	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	101
4.1.	RESULTADOS.	101
4.1.1.	Resumen estadístico de las variables representativas.	101
4.1.2.	Resumen estadístico del total de las estructuras encontradas luego del lavado de las vacas.	101
4.1.3.	Resumen estadístico del total de embriones transferibles y no transferibles.	102
4.1.4.	Análisis estadístico de las variables estudiadas.	103
4.2.	DISCUSIONES.	114
V	CONCLUSIONES	116
VI	RECOMENDACIONES	117
VII	BIBLIOGRAFÍA	118
	ANEXOS	123



Anexo 5. Protocolo de superovulación en vacas control sin eCG en vacas Donadoras (Sin eCG, con Folltropin-V) utilizado para donadoras.....	128
ANEXO 9. PRESUPUESTO.....	132
ANEXO 10. FOTOGRAFIAS:.....	133
GLOSARIO.....	138

INDICE DE CUADROS

CUADRO	PAG.
1. Dosis de FSH en ganado adulto Bos Taurus.....	42
2. Dosis de FSH en ganado con hipersensibilidad.....	43
3. Dosis de Folltropin-V para diferentes razas, pesos y edades en ganado bovino.....	44
4. Tratamiento de superovulación con diferentes productos.....	45
5. Tratamientos de superovulatorios tradicionales.....	52
6. Tratamiento tradicional de superovulación.....	53
7. Protocolo brasileiro para superovulación en ganado.....	54
8. Protocolo combo para superovulación en ganado bovino.....	55
9. Composición del medio Dulbecco's Fosfato Buffer Salino (PBS) para colección y mantenimiento de embriones.....	61
10. Guía propuesta por la Asociación Internacional de Transferencia de Embriones (IETS).....	69
11. Datos meteorológicos del cantón Chambo.....	88
12. Distribución de los tratamientos de estudio.....	90
13. Cronograma de Superovulación con eCG.....	94
14. Operacionalidad de las Variables.....	99
15. Estadística descriptiva de las Variables.....	101
16. Estadística descriptiva del Total de las estructuras encontradas en la investigación por tratamiento.....	102
17. Embriones transferibles y no transferibles generados en la investigación.....	102
18. Chi cuadrado del Número de cuerpos lúteos	



encontrados en la investigación.....	103
19. Chi cuadrado del Número de folículos anovulatorios encontrados en la investigación.....	104
20. Chi cuadrado del total de estructuras embrionarias encontradas en la investigación.....	105
21. Chi cuadrado del grado de morulación encontrados en la investigación.....	106
22. Chi cuadrado del grado de blastocistos encontrados en la investigación.....	107
23. Chi cuadrado de las estructuras embrionarias viables encontradas en la investigación.....	108
24. Análisis de varianza de la presencia de cuerpos lúteos, folículos anovulatorios y estructuras encontradas.....	110
25. Análisis de varianza de las estructuras embrionarias encontradas (Ovocitos fertilizados, Mórulas y Blastocistos).....	111
26. Análisis de varianza del grado de morulación de los embriones.....	112
27. Análisis de varianza del grado de Blastocistos.....	113
28. Análisis de varianza de las estructuras embrionarias transferibles y no transferibles.....	113



ÍNDICE DE GRAFICOS

GRAFICO	PAG.
1. Representación en barras de la presencia de cuerpos lúteos en los ovarios.....	103
2. Representación en barras de los folículos anovulatorios obtenidos en la investigación.....	104
3. Representación en barras de las estructuras embrionarias encontradas en los dos tratamientos.....	106
4. Representación en barras del grado de Morulación.....	107
5. Representación en barras del grado de Blastocisto.....	108
6. Representación en barras de los embriones transferibles Y no transferibles.....	109

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURAS	PAG.
1. Embriones bovinos.....	67
2. Mórula y Blastocisto.....	68
3. Esquema de llenado de la pajilla.....	84



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

Yo, Diego Ismael Salinas Montenegro, autor de la tesis "Efecto de la aplicación de Gonadotrofina Coriónica Equina (eCG) en vacas donantes superovuladas con follitropin-v (FSH-p liofilizada)" reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Magister en Reproducción Animal. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autor.

Cuenca, 10 mayo del 2013

Diego Ismael Salinas Montenegro

1400698302

Cuenca Patrimonio Cultural de la Humanidad. Resolución de la UNESCO del 1 de diciembre de 1999

Av. 12 de Abril, Ciudadela Universitaria, Teléfono: 405 1000, Ext.: 1311, 1312, 1316

e-mail cdjbv@ucuenca.edu.ec casilla No. 1103

Cuenca - Ecuador



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

Yo, Diego Ismael Salinas Montenegro, declaro que en el presente trabajo de investigación los datos y conceptos emitidos son de mi exclusiva responsabilidad.

Cuenca, 10 mayo del 2013

Diego Ismael Salinas Montenegro

1400698302

Cuenca Patrimonio Cultural de la Humanidad. Resolución de la UNESCO del 1 de diciembre de 1999

Av. 12 de Abril, Ciudadela Universitaria, Teléfono: 405 1000, Ext.: 1311, 1312, 1316

e-mail cdjbv@ucuenca.edu.ec casilla No. 1103

Cuenca - Ecuador



El Tribunal de Tesis de Grado

C E R T I F I C A:

Que el presente trabajo de tesis: “Efecto de la aplicación de Gonadotrofina Coriónica Equina (eCG) en vacas donantes superovuladas con folltropin-v (FSH-p liofilizada)”, elaborado por el M.V.Z. Diego Ismael Salinas Montenegro, ha sido revisado minuciosamente, quedando autorizada su presentación.

Cuenca, 10 de Mayo del 2013

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

MIEMBRO TRIBUNAL



Dr. Carlos Jiménez Alvarado, Director de Tesis

C E R T I F I C A:

Que el presente trabajo de tesis: “Efecto de la aplicación de Gonadotrofina Coriónica Equina (eCG) en vacas donantes superovuladas con folltropin-v (FSH-p liofilizada).”, elaborado por el M.V.Z Diego Ismael Salinas Montenegro, ha sido correctamente elaborado y revisado, quedando autorizada su presentación.

Cuenca, 10 de mayo del 2013

Dr. Carlos Jiménez Alvarado Msc.

DIRECTOR TESIS

AGRADECIMIENTO

Agradezco al Dr. Carlos Jiménez director de tesis, por sus conocimientos, orientación y amistad.

A los miembros del Tribunal de grado por el tiempo brindado en la revisión y sustentación de la tesis.

Al Dr. Rodrigo Muñoz por su invaluable conocimiento y guía durante los trabajos de campo, además

Agradezco al Ing. Esteban Brito propietario de la hacienda por confiar en la investigación.

A todo el personal directivo de la maestría, especialmente al Dr. Jhonny Narváez por su gran labor; a todos los prestigiosos docentes nacionales y extranjeros que nos impartieron sus grandes y valiosos conocimientos durante los diferentes módulos.

Agradezco a la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca por el apoyo infinitamente brindado durante todo este tiempo.

Diego Salinas M.



DEDICATORIA

Dedico este trabajo a Dios agradeciéndole infinitamente por estar siempre a mi lado y permitirme alcanzar un logro más en esta hermosa profesión.

Dedico a mi querida esposa, quien con su apoyo constante me ha motivado para seguir adelante superándome profesionalmente; también a mis padres, hermanos y a todas las personas que intervinieron directa o indirectamente en la culminación de este nuevo proyecto en mi vida.

Diego Salinas M.

I INTRODUCCIÓN

La evolución de los conocimientos en la biología de la reproducción de mamíferos en los últimos años ha abierto las puertas a la utilización de nuevas biotecnologías en la reproducción animal, ofreciendo de un lado, posibilidades a los individuos que en condiciones normales no podrían reproducirse, y por otra parte, acelerando los esquemas genéticos de selección, ampliando la población de grupos de individuos en un tiempo más reducido, obteniendo de ésta manera progresos genéticos en más corto tiempo (Hincapie J, 2005).

Con la finalidad de incrementar la tasa reproductiva de la hembra bovina se desarrolló la transferencia de embriones hace 20 años. La experiencia obtenida en ese tiempo indicó que el efecto de la transferencia de embriones sobre la multiplicación de la descendencia es limitado, consiguiendo con esto disponer de embriones en estadios tempranos durante su tránsito uterino (Velez M, 2006).

El uso de eCG que tiene actividad similar a la FSH y LH se utiliza para incrementar el número y la calidad de los embriones para transferir en fresco o congelar, debido a que tiene una larga vida media en la sangre permitiendo inducir a la superovulación en la hembra bovina mediante la administración de una dosis única entre los días 8 y 14 del ciclo estral (Barros & Barcelos, 2008).

A nivel de Sudamérica es muy conocida la técnica de la superovulación y transferencia de embriones en vacas, sin embargo no es muy utilizada debido a que existe un bajo número de embriones obtenidos (promedio 5 embriones por lavado), por lo que se desea aplicar este tratamiento bajo condiciones controladas con el fin de mejorar su eficiencia y disminuir los costos de cosecha de embriones y hacerle más rentable para el ganadero.

Para el presente trabajo de investigación nos planteamos los siguientes objetivos:

OBJETIVOS:

Objetivo General.

- Evaluar el papel de la gonadotrofina coriónica equina (eCG) añadida a un tratamiento superovulatorio con el fin de incrementar el número de embriones viables y transferibles.

Objetivos específicos.

- Comparar el efecto de la adición de eCG a los tratamientos superovulatorios con FSH-p (Folltropin-V) en vacas Holstein friesian.
- Determinar el número de cuerpos lúteos en el ovario, el número de ovocitos-Embrión totales colectados, el número y la calidad de ovocitos fertilizados; y la cantidad de embriones transferibles.



II REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. HISTORIA Y SITUACIÓN ACTUAL DE LA OVULACIÓN MÚLTIPLE Y LA TRASFERENCIA DE EMBRIONES.

La transferencia de embriones es una técnica por la cual los embriones son colectados de una hembra donante y transferidos a una hembra receptora que gesta y pare a los productos. Este proceso requiere el uso de gonadotrofinas para inducir la superovulación en la donadora y sincronizar el ciclo estral de las receptoras para que manifiesten celo al mismo tiempo (Mosquera, 1994).

Al principio de los años 70 comenzó el gran interés comercial en la transferencia de embriones en el bovino y en el año de 1973 se realizó la primera transferencia exitosa de un embrión congelado y hoy día se realizan cientos de miles de obtenciones y transferencias en bovinos anualmente en todo el planeta. En bovinos el procedimiento es completamente no quirúrgico y los embriones se pueden mantener almacenados indefinidamente mediante criopreservación (Betteridge, 2003).

La transferencia de embriones está dentro de un marco de mejoramiento genético y se puede hacer tanto en fresco como también en forma congelada. El trabajo consiste en superovular vacas élite de alta producción, para poder multiplicar esa genética, es decir, consiste en extraer embriones aun no implantados, del conducto reproductor de la madre donante (madre genética), por perfusión con un medio apropiado, para luego depositarlos en el conducto de una hembra receptora (madre nutricia) de la misma especie, donde se obtiene la gestación a término (Mosquera, 1994).

Los avances logrados en el conocimiento de la fisiología reproductiva en los últimos años han llevado a la simplificación de los tratamientos

superovulatorios, pero a pesar de esto el promedio de embriones transferibles que se obtiene en la actualidad es similar al que se registra desde hace más de 12 años que está en promedios de cinco embriones (Hincapie J & Campo, 2005).

La superovulación es el estímulo hormonal del ovario para aumentar el número de folículos producidos durante el estro, por medio de la aplicación de diferentes tipos de hormonas, entre las cuales se destacan la Hormona Folículo Estimulante (FSH) y la Gonadotropina Coriónica Equina (eCG). Con esto se permite que las hembras con un alto mérito genético tengan un número de crías superior al normal (Vélez & Santillán, 2002).

El uso de eCG que tiene actividad similar a la FSH y LH se utiliza para incrementar el número y la calidad de los embriones para transferir en fresco o congelar, debido a que tiene una larga vida media en la sangre permitiendo inducir a la superovulación en la hembra bovina mediante la administración de una dosis única entre los días 8 y 14 del ciclo estral (Barros & Barcelos, 2008) (Baruselli P. R., 2004).

Las ventajas de Superovulación y Transferencia de Embriones: Incrementar la producción de hembras genéticamente superiores. Acelerar el progreso genético. Recuperación genética de animales accidentados o enfermos permanentes de los que pudieran obtenerse embriones antes de que el animal muera. Conservación de especies en extinción. Diagnóstico, tratamiento y recuperación de las funciones reproductivas de hembras con infertilidad de origen no genético. Control y prevención de enfermedades infecciosas. Importación y exportación. Maximizar el uso de semen de alto valor. Ayudar a la aclimatación de ciertas razas a distintos medios ambientes. Las desventajas, más bien, deben ser consideradas como requerimientos: Condiciones adecuadas, principalmente nutricionales. Equipo especial. Personal técnico



capacitado (conocimiento y experiencia). Sementales y hembras donantes de alta genética. Falta de predicción de resultados en número de embriones transferibles por vaca y número de gestaciones (Mosquera, 1994).

La OMTE (Ovulación múltiple y Transferencia de Embriones, es una biotecnología nueva, ya que existe datos que en 1980, Walter Heape transfirió embriones de 4 células de una coneja de raza angora acuna de raza Belga inseminada, donde resultó el nacimiento de cuatro gazapos de la raza Belga y dos de la raza Angora sin que se reportaran eventos posteriores en mamíferos hasta los años 20's, cuando diferentes investigadores reportaron la técnica de transferencia de embriones en conejos (Betteridge, 2003).

Posteriormente, Warwick y colaboradores realizaron durante los años 30's y 40's un trabajo considerable sobre la transferencia de embriones (TE) en ovinos y caprinos y fue Unbaugh el primero que reporto un evento de TE en bovinos el 1949, el obtuvo cuatro preñeces de embriones bovinos transferidos, pero todas las receptoras abortaron antes de que la gestación llegara al término (Mapletoft, 2005).

En 1951, Willet y colaboradores lograron el nacimiento del primer becerro de un embrión de 5 días de edad obtenido del rastro. Posteriormente, Rowson y colaboradores en Cambridge Inglaterra desarrollaron la técnica de Transferencia de embriones de que posteriormente seria de uso comercial (Seidel G. , 1981).

En México en los años 70's, se inicia con la TE y comenzó el gran interés comercial en la transferencia de embriones en el bovino y en el año de 1973 se realizó la primera transferencia exitosa de un embrión congelado y hoy día se realizan cientos de miles de obtenciones y transferencias en bovinos anualmente en todo el planeta. En bovinos el procedimiento es



completamente no quirúrgico y los embriones se pueden mantener almacenados indefinidamente mediante criopreservación (Avila, 2009).

En el año de 1981 en Ecuador la transferencia de embriones comenzó primero con un sin número de ciclo de conferencias en la facultad de medicina veterinaria y zootecnia de la Universidad Central del Ecuador, luego en el año de 1985 se ejecutaron transferencia de embriones frescos de ganado vacuno y empezaron a nacer los primeros terneros con este trabajo. En 1987 dos terneros nacieron en Ecuador como resultado de la transferencia de embriones congelados (Gorfrey, 1991).

La TE es una industria que ha crecido rápidamente en los últimos años, tanto en el número de profesionales en el área como el número de donadoras que han sido sometidas al proceso de colecta. Al respecto,) en el año 1979 se reportó más de 1700 preñeces en los Estados Unidos resultaron de la TE (Seidel G. , 1991).

Recientemente, en el año 2002, se reportó un total de 538312 embriones fueron transferidos en todo el mundo. Norteamérica sigue siendo el centro de actividad comercial de la TE, con más de 42000 donadoras superovuladas y más de 190000 embriones transferidos (35% de los embriones transferidos mundialmente). No obstante, la OMTE en los EUA actualmente se encuentra estática o en declive, lo que ha representado una oportunidad de expansión en América del Sur, que aporó el 22% de los embriones transferidos en todo el mundo en el año 2002, mientras que Europa y Asia reportaron alrededor del 17% de los embriones transferidos en el 2002 (Thibier, 2003).

En Canadá, según la Asociación Canadiense de Transferencia de Embriones (CETA) más del 70% de las transferencias de embriones se realizan en el ganado lechero y aproximadamente el 70% de los embriones producidos in-vivo son congelados anualmente, de los cuales 22.000 han sido exportados en el 2006. La mayoría de los embriones



transferidos en Canadá son para aumentar la descendencia de hembras “elite” puro registradas. Este es el más importante uso de la transferencia de embriones en este país, donde de los 122 toros Holandos en el mercado para IA, 39 fueron producidos por transferencia de embriones (CETA, 2006).

Brasil, es quizá es uno de los países sudamericanos donde la actividad de la OMTE, representa una actividad económica importante, según el último reporte en el año 2007, de la Sociedad Brasileira de Tecnología de Embriones (SBTE), donde a pesar de la creciente producción de embriones in vitro se obtuvieron 70000 embriones in vivo, lo que representa alrededor de 15000 ovulaciones múltiples al año. Estos resultados colocan a Brasil en el escenario mundial de la producción de embriones (Sá Filho, y otros, 2010).

En el País de México, a pesar de los esfuerzos realizados por introducir la técnica de ovulación múltiple y transferencia de embriones, han resultado poco fructíferos ya que solamente una pequeña parte de los productores bovinos del país la utilizan de manera cotidiana, quedando solamente en manos de los productores de pie de cría o ganado de registro que comercializan embriones o bien semen de animales valiosos (Bousquet D, 1999).

2.1. USO DE LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES.

A pesar de que la transferencia de embriones presente algunas dificultades, es una técnica que se ha empleado en forma creciente en los últimos 10 años, ya que proporciona ventajas en el mejoramiento genético, bioseguridad, uso de otras tecnologías reproductivas (ejemplo Inseminación Artificial, semen sexado, fertilización in vitro, etc.) transporte de germoplasma y conservación de material genético (Barceló, 2010).

2.1.1. Mejoramiento genético.

Convencionalmente se ha utilizado la selección y los apareamientos planeados para incrementar la producción de carne; para lo cual se ha puesto especial énfasis en el macho, ignorando el potencial de la hembra. La transferencia de embriones es una herramienta de gran utilidad que permite utilizar al máximo la capacidad reproductiva de las hembras de gran valor genético, ya que permite incrementar la intensidad de selección de las hembras destinadas a la producción de machos superiores, al disponer de un número mayor de crías por hembra; y además, permite acortar el intervalo generacional al evaluar a los animales a través de grupos grandes de hermanos, en lugar de hacerlo a través de su progenie (Barceló, 2010).

Mediante la implementación de programas MOET (multiple Ovulation and Embryo Transfer, por sus siglas en inglés), se ha logrado reducir el intervalo generacional y el costo del proceso de la evaluación genética en la selección de sementales para su uso mediante IA, al reducir el número de animales que entran a prueba de progenie mediante su selección previa con la información de sus hermanos. Por otra parte, también permite introducir y difundir nuevas razas, en donde las características deseables de alta heredabilidad pueden ser rápidamente multiplicadas (Barceló, 2010).

2.2.2. Bioseguridad.

La transferencia reducen los riesgos de transmisión de agentes patógenos y por ende, la transmisión de enfermedades ya que en la zona pelúcida del embrión antes de la extrusión constituye una barrera natural en contra de agentes patógenos como virus y bacterias. Se ha demostrado que es posible obtener embriones sin riesgos sanitarios de

enfermedades como: brucelosis, fiebre aftosa, etc. Por lo que con la TE puede lograr la producción de hatos libres de enfermedades.

Existen casos donde las donadoras están infectadas con enfermedades crónicas como la neumonía y se puede obtener crías libres de estos patógenos, a través del lavado de embriones con tripsina, de acuerdo a los procedimientos establecidos en el manual de transferencia de embriones de la sociedad internacional de transferencia de Embriones (IETS, por sus siglas en ingles) (Massimiliano, 2009) (Barceló, 2010).

2.2.3. Uso de otras técnicas reproductivas.

En la producción de embriones se puede utilizar semen fresco o criopreservado, así como semen sexado a través del sistema Belstville, hoy en día disponible para la selección del sexo. La TE también se puede complementar con la micro manipulación embrionaria, en donde por medio de la bipartición se incrementa la tasa de gemelos idénticos. Además, permite la obtención de embriones de algunos de los animales considerados como infértiles, a través de la fertilización in vitro (Bousquet D, 1999) (Barceló, 2010).

2.2.4. Transporte de Germoplasma.

Permite la fácil movilización de germoplasma, con menor costo de envío, menos requerimientos de cuarentena y por potencial de riesgos sanitarios, en comparación con el movimiento de animales, lo que facilita la comercialización de material genético a través de países y/o regiones (Barceló, 2010).

2.2.5. Conservación del material genético.

A través de la criopreservación se puede conservar embriones por tiempo indefinido en nitrógeno líquido, esto permite la formación de bancos de

germoplasma para el resguardo de genes y genotipos de interés para la conservación de razas o especies (Barceló, 2010).

2.3. SELECCIÓN DE DONADORAS Y RECEPTORAS.

2.3.1. Donadoras.

En un programa de Superovulación y Transferencia de Embriones en bovinos, la elección de las hembras donadoras debe realizarse con base en las características genotípicas que expresen el mejor fenotipo de las hembras en un ambiente dado, no obstante, cada ganadero tiene sus propias razones para la selección de sus donantes, las cuales son a menudo más subjetivas que genéticas. En realidad el factor económico deberá ser el más importante en el programa de transferencia embrionaria, y por lo tanto al conseguir resultados óptimos se conseguirán reducir los costos inmediatos, pero subsidiariamente al hacer una buena elección desde el punto de vista genético los costos se reducirán también en el futuro. Por tanto la selección de la vaca donante es un evento crítico del cual depende el éxito del programa (Mosquera, 1994).

Con el fin de lograr los mejores resultados se deben considerar los siguientes aspectos:

- a) Buen estado sanitario de la donante y Explotación.
- b) Alto valor genético, con aptitudes productivas superiores para su raza.
- c) Ciclos estrales regulares, si se utiliza hembras nulíparas, estas deben tener al menos 60% del peso adulto de la raza y haber presentado estros anteriormente.
- d) Sin problemas patológicos, en especial las patologías reproductivas y las asociadas al parto.

- e) Buena condición corporal 2-2,5 (escala 1 – 5)
- f) Sin enfermedades de transmisión genética.
- g) Las donantes deben tener una edad de 3 a 10 años de edad, dependiendo de la raza y tipo de explotación, evitar el uso de hembras jóvenes (baja eficiencia reproductiva, 25% menos).
- h) Dar al animal un periodo de adaptación al lugar en que se va a manejar de al menos un mes (Mosquera, 1994).

2.3.2. Receptora.

La receptora es el complemento fundamental y determinante para el éxito del programa de transferencia embrionario. Si la vaca o vaquilla no tiene una condición corporal de 3-4 (Escala de 1-5) durante el proceso o está en pérdida de peso, existe alta probabilidad de que no haya éxito.

Características de la receptora ideal:

- a) Si es cruzada, que tenga menos del 75% de encaste cebuino, y que posea cruce con línea lechera, temperamento tranquilo y evidente amplitud pélvica
- b) Talla media a grande.
- c) Que haya parido sin dificultad y destetado a la cría de buen tamaño y peso.
- d) Joven y libre de enfermedades infectocontagiosas.
- e) Temperamento tranquilo.
- f) En franca ganancia diaria de peso.

El recipiente ideal es una vaca joven, libre de enfermedades, fértil y con buena habilidad materna. La raza parece no tener una consideración significativa, aunque los animales cruzados generalmente son más fértiles. Sin embargo, desde el punto de vista comercial, la preferencia comercial del cliente por determinada raza puede ser muy importante (Avila, 2009).

Las vacas viejas (mayores de 8 años) no deberá utilizarse por su decreciente habilidad en mantener la preñez, pero al lado de esto, la edad no es un factor importante en la búsqueda de recipientes con más de un parto (plurípara). A más de ello deben estar identificadas las receptoras con números visibles que se puedan leer a distancia (arete) para evitar el estrés por manejo en la medida de lo posible deben desparasitarse con anticipación de acuerdo con su situación geográfica para ello considerar al menos 60 días pos-parto (Sidel, 1986).

Seleccionar la hembras 4 a 8 semanas antes de la sincronización, con un periodo mínimo de adaptación de al menos 3 semanas antes de iniciar el proceso de sincronización (Barceló, 2010).

La compra de novillas preñadas es una buena fuente de futuras recipientes. Con buenos sistemas de manejo, estos animales estarán listos para la transferencia de embriones 60 días después del parto. Esta respuesta requiere considerablemente planeación, una fuente de alimentación económica y buena información sobre fechas de servicio para evitar que la época de partos no cubra muchos meses (Gorlach, 1997).

2.4. FISIOLÓGÍA REPRODUCTIVA DEL BOVINO.

2.4.1. Control Neurológico del Ciclo Estral.

El ciclo estral está regulado por una interacción hormonal regida por el eje hipotálamo-hipófisis el ovario y el útero (Callejas, 1995).

Las hormonas sirven como mensajeros químicos que viajan por la sangre hacia órganos y tejidos específicos que contienen receptoras para hormonas específicas y que regulan la fase del ciclo estral (Lamp, 2009).

2.4.1.1. Hipotálamo. Forma la base del cerebro, y sus neuronas producen la hormona liberadora de gonadotrofina o GnRH. El GnRH, en la eminencia media, difunde a los capilares del sistema porta hipofisiario y de aquí a las células de la adenohipófisis en donde su función es estimular la síntesis y secreción de las hormonas hipofisiarias, FSH (Hormona Folículo Estimulante) y LH (Hormona Luteinizante). (Rippe, 2009).

2.4.1.2. Hipófisis. Está formada por una parte anterior o adenohipófisis y una posterior o neurohipófisis. La adenohipófisis produce varios tipos de hormonas, de las cuales la FSH y LH cumplen un papel relevante en el control neuroendócrino del ciclo estral. La FSH es la responsable del proceso de esteroideogénesis ovárica, crecimiento y maduración folicular, y la LH interviene en el proceso de esteroideogénesis ovárica, ovulación, formación y mantenimiento del cuerpo lúteo. Estas hormonas son secretadas a la circulación en forma de pulsos y son reguladas por dos sistemas, el tónico y el cíclico. El sistema tónico produce el nivel basal circulante, siempre presente, de hormonas hipofisiarias las cuales promueven el desarrollo de los elementos germinales y endócrinos de las gónadas. El sistema cíclico opera más agudamente, siendo evidente por solo 12 a 24 horas en cada uno de los ciclos reproductivos de la hembra. El modo cíclico tiene por función primaria causar la ovulación. La neurohipófisis almacena la oxitocina producida en el hipotálamo. Esta hormona tiene varias funciones como son intervenir en el mecanismo del parto, bajada de la leche, transporte espermático e intervendría en el proceso de luteólisis (Callejas, 1995) (Lucy, 2007).

2.4.1.3. Ovarios. Son glándulas exócrinas (liberan óvulos) y endócrinas (secretan hormonas). Entre las hormonas que producen los ovarios podemos citar a los estrógenos, la progesterona y la inhibina. Los estrógenos, hormonas esteroideas, son producidos por el folículo ovárico y tienen acciones sobre los distintos órganos blanco como son las

trompas de Falopio, el útero, la vagina, la vulva y el sistema nervioso central, en el cual estimulan la conducta de celo y el hipotálamo donde ejercen un "feed back" negativo sobre el centro tónico y positivo sobre el centro cíclico. La progesterona, hormona esteroidea, es producida por el cuerpo lúteo por acción de la LH. Los efectos de la progesterona se observan después que el tejido blanco ha estado expuesto durante cierto tiempo a la estimulación de los estrógenos. Esta preparación por los estrógenos conduce a un efecto sinérgico. La progesterona prepara el útero para el implante del embrión y para mantener la gestación. A nivel hipotalámico ejerce un efecto feed back negativo sobre el centro tónico. La inhibina, hormona proteica, es producida por el folículo ovárico (células granulosas) e interviene en el mecanismo de regulación de la secreción de FSH. Ejerce un feed back negativo a nivel hipofisiario, produciendo una menor secreción de FSH (Massimiliano, 2009).

2.4.1.4. Útero. Produce la prostaglandina F2a (PGF2a), la cual interviene en la regulación neuroendócrina del ciclo estral mediante su efecto luteolítico. Otras funciones son la de intervenir en los mecanismos de ovulación y del parto (Callejas, 1995).

2.4.2. Ciclo Estral.

A continuación describiremos los eventos principales que ocurren durante el ciclo estral. El ciclo estral se puede dividir en tres fases:

- a) Fase folicular o de regresión lútea (proestro)
- b) Fase periovulatoria (estro y metaestro)
- c) Fase luteal (diestro).

El día cero del ciclo estral es el día del celo o calor aparente con signos manifiestos y se considera el día del comienzo del nuevo ciclo; sin embargo, y para efectos de mejor entendimiento, la descripción se

realizará a partir de la destrucción del el cuerpo lúteo del ciclo anterior y finalizará con el día de celo del siguiente ciclo. (Lucy, 2007)

2.4.2.1. Fase Folicular. La fase del Proestro se inicia con la regresión del cuerpo lúteo del ciclo anterior o luteólisis y termina con el inicio del celo o estro; dura alrededor de dos o tres días. Al producirse la destrucción del cuerpo lúteo tenemos una caída en los niveles de progesterona y posteriormente una pérdida de tejido luteal, siendo la PGF2a de origen uterino el principal luteolítico en los animales domésticos y en la mayoría de los roedores. Como consecuencia de la caída de los niveles de progesterona, disminuye el feed back negativo que dicha hormona tenía a nivel hipotalámico y comienzan a aumentar la frecuencia pulsátil de las hormonas gonadotróficas (FSH y LH) y se estimula el crecimiento folicular con el desarrollo de un gran folículo y el aumento en los niveles de estradiol. Cuando los estrógenos alcanzan cierto nivel, se estimula la receptividad al macho y comienza el período de celo o estro (Callejas, 1995) (Lucy, 2007).

2.4.2.2. Fase Periovulatoria. El estro define como un periodo de actividad y receptividad sexual en donde el signo principal es que el animal se mantiene en pie y quieto al ser montado por otro. También se observa, entre otros signos, inquietud, inflamación de la vulva, secreción de moco claro y transparente que sale por la vulva. El olor de moco atrae y excita al toro debido a la presencia de feromonas. La duración del celo es muy variable entre grupos de animales variando entre 30 minutos a más de 30 horas pero se considera que 16+- 4 horas es el tiempo promedio. (Hincapie J & Campo, 2005).

Los signos de estro ocurren gracias a la presencia de los estrógenos provenientes del folículo. En cierto momento los niveles de estrógenos son lo suficientemente altos en concentración y duración como para



inducir los síntomas de celo o calor, así como para incrementar las contracciones del tracto reproductivo facilitando el transporte del esperma y ovulo; estos altos niveles de estrógenos afectan también a centros endócrinos en el hipotálamo que controlan la liberación de GnRH del Hipotálamo y esta a su vez la liberación de FSH y LH de la adeno-hipófisis (Hincapie J & Campo, 2005).

El incremento de LH se inicia después de que se hayan iniciado los signos de celo e inicia el proceso de ovulación. La LH es generalmente considerada como la gonadotropina primaria responsable de la ovulación, sin embargo, la FSH también ha sido observada como causante de la ovulación y de formación luteal. De 12 a 24 horas desde el comienzo del celo, el sistema nervioso central del animal se hace refractario a los estrógenos y todas las manifestaciones de celo o calor desaparecen (Hincapie J & Campo, 2005) (Lucy, 2007).

Inmediatamente después de finalizado el celo se inicia el metaestro que puede durar de 3 a 5 días. Durante el metaestro ocurre la ovulación, que tiene lugar entre 28 a 32 horas después de haberse iniciado el celo, o entre 10 a 15 horas de haber cesado los signos de celo en respuesta al pico preovulatorio de LH. Después de la ovulación se produce una hemorragia y el folículo se llena de sangre, convirtiéndose en una estructura conocida como cuerpo hemorrágico. El proceso siguiente es la luteinización de las células foliculares que se transformaran en células luteales; estos cambios ocurren entre el día 5 a 7 del ciclo, finalizando así la fase de metaestro e iniciándose la fase lútea o diestro (Lucy, 2007).

2.4.2.3. Fase Luteal. El Diestro se caracteriza por el dominio del cuerpo lúteo. El mantenimiento del cuerpo lúteo, así como la síntesis de progesterona está ligada a la hormona LH que es progesterotrófica y luteotrófica. Otras hormonas que intervendrían en la síntesis de progesterona, son la FSH y la PGI₂. La FSH se uniría a receptores ubicados en el cuerpo lúteo y provocaría un aumento en la secreción de progesterona. En lo referente a la PGI₂ además de estimular a las células luteales para producir progesterona, aumentaría el flujo sanguíneo a nivel ovárico con el efecto positivo que esto significa sobre la síntesis y secreción de progesterona. Si el huevo no es fecundado, el cuerpo lúteo permanece funcional hasta el día 15-20, después del cual comienza la regresión en la preparación de un nuevo ciclo estral (Lucy, 2007).

2.4.3. Dinámica Folicular Bovina.

Se conoce como dinámica folicular al proceso de crecimiento y regresión de folículos antrales que conllevan al desarrollo de un folículo preovulatorio. En vacas, el desarrollo folicular ocurre en forma de ondas y se observan tanto en animales jóvenes como adultos, en vacas preñadas (excepto durante los últimos 30 días de gestación) y durante el ciclo estral. Entre 1 y 4 ondas de crecimiento y desarrollo folicular ocurren durante un ciclo estral bovino, y el folículo preovulatorio deriva de la última (Lucy, 2007).

El proceso por el cual los folículos se desarrollan en la vaca consta de 3 estados que son: Reclutamiento, Selección y Dominancia: para entender la dinámica folicular bovina debemos definir estos conceptos:

Reclutamiento: Un cohorte de folículos de aproximadamente 3 mm de diámetro es estimulado por un aumento transitorio de la hormona FSH. El pico de FSH ocurre cuando el futuro folículo dominante alcanza un

tamaño de aproximadamente 4mm y luego los niveles de FSH disminuyen. El proceso por el FSH declina es desconocido (Lucy, 2007).

Selección: Es el proceso por el cual un folículo es elegido para ser dominante y evita la atresia, los demás folículos de esa cohorte se vuelven atrésicos, tal vez por la disminución en los niveles de FSH (Lucy, 2007).

Dominancia: Es el proceso por el cual el folículo dominante ejerce un efecto inhibitorio sobre el reclutamiento de una nueva cohorte de folículos. Este efecto inhibitorio se mantiene hasta que esta dominancia desaparece bien porque el folículo muere o porque el folículo es ovulado. Este folículo que alcanza un tamaño marcadamente mayor que los demás es el responsable de la secreción de estradiol y adquiere la capacidad de continuar creciendo incluso en presencia de otras hormonas que crean un medio adverso para el resto de los folículos. Con la ovulación o destrucción del folículo dominante, se produce un nuevo incremento de FSH y una nueva onda folicular se inicia (Lucy, 2007).

El ciclo estral bovino consta básicamente de 2 ondas foliculares y cada una de ellas comienza con el reclutamiento de una cohorte de folículos antrales a partir de un grupo de pequeños folículos. Solo uno de ellos será seleccionado de esta cohorte y continuará creciendo convirtiéndose en el folículo dominante; los demás se convertirían en folículos atrésicos (Massimiliano, 2009).

Inmediatamente después de la ovulación, una nueva onda folicular comienza, el folículo dominante de esta onda no podrá ser ovulado por la presencia de altos niveles de progesterona y se volverá atrésico; inmediatamente una nueva onda folicular se inicia. El folículo dominante de la segunda onda folicular que está presente cuando la luteólisis ocurre, generalmente llegara a ser el folículo ovulatorio del celo. Los ciclos estrales en vacas con 3 ondas foliculares son generalmente más largos

(20-24 días) comparados con los ciclos estrales de vacas con 2 ondas foliculares (8-20 días) (Massimiliano, 2009).

La actividad folicular está normalmente ausente en los primeros 10 días posteriores al parto, pero normalmente comienza rápidamente posterior a éste momento. En vacas lecheras bien alimentadas, la actividad de onda folicular se acompaña por dominancia folicular, entonces es común encontrar presentación de celo y ovulación desde los 10 días de paridas; la vaca de carne es similar; el reinicio de las ondas foliculares ha sido observada a los 10 días del parto, sin embargo la ovulación ocurre más tarde que en la vaca de leche (media 30.6 días). En las vacas con condición corporal no deseable y/o pobremente alimentadas, la actividad folicular también se reinicia en este momento, pero la dominancia puede estar ausente por varias semanas. En algunas vacas primíparas se han observado hasta 11 ondas foliculares antes que un folículo dominante finalmente ovulará (Massimiliano, 2009).

2.5. MANEJO Y PREPARACIÓN DE LOS ANIMALES DONANTES.

En la preparación de los programas de Transferencia de Embriones (TE) hay que tener en cuenta que se deben conservar los animales donantes en su ambiente normal, desde la inducción de la superovulación hasta el lavado y recogida de los embriones evitándose situaciones extraordinarias que desencadenen estrés como presentación a exposiciones y concursos. Si para la realización de la TE es inevitable que se efectué un cambio de establo, se llevará a cabo de 2 a 4 semanas antes de comenzar la superovulación para que tenga un tiempo de adaptación al lugar definido. Ya se ha demostrado en el pasado que un cambio de patios en la donante con el consecuente estrés social que sufre el animal es, a menudo, la causa de fracaso en la TE, de la misma manera que también lo son cambios transitorios como la estabulación desde los pastos a establos nuevos o estabulación en establos extraños en caso de compra o de

reunir varios individuos donantes de diferentes rebaños. Cualquier cambio (incluso dentro de la misma explotación o cambio de alimentación) implica la necesidad de un tiempo de adaptación para el animal cuya duración varia individualmente la introducción en un nuevo medio ambiente, que incluye luchas para la instauración del rango social y otros factores estresantes (establo, tratamientos, clima) desencadena un síndrome de adaptación que provoca esterilidad. En situaciones límites de estrés se bloquea en la vaca la reproducción puesto que la propia supervivencia es más relevante en ese momento que la propagación de la especie. Animales estresados no responden a los tratamientos hormonales para inducir la superovulación independientemente del producto o la dosis aplicada (Gorlach, 1997).

La condición básica para la buena reacción de un animal a los tratamientos hormonales es un bienestar del mismo. Situaciones de manejo esporádicas como la sujeción para la inyección o la inseminación artificial son inofensivas. Pero cualquier práctica de manejo prolongada en el tiempo que estrese el animal se debe evitar también tras la superovulación, puesto que interfiere en el desarrollo normal de los embriones (Gorlach, 1997).

2.5.1. Sincronización Previa.

Para la planificación y organización de un programa de TE, donde se incluyen varias donantes, es indispensable confeccionar previamente un plan de sincronización, según el cual las hembras serán sincronizadas con una variación de $-/+3$ días y los celos de las donantes a nuestra disposición deben de presentarse con una diferencia temporal de al menos 7 días entre ellos. La sincronización previa de 4 a 5 vacas donantes para un programa de TE es lo ideal porque, por un lado, tenemos la seguridad de no salir con las manos vacías aunque falle una u otra y, por el otro, el lavado de 5 animales con las trasferencias y/o la

crioconservación de los embriones obtenidos es factible a lo largo de un día (Gorlach, 1997).

La sincronización se puede realizar como pronto 4 semanas posparto, en caso de vacas, siempre y cuando hayan mostrado previamente un primer celo natural tras del parto y no presenten ninguna anormalidad de tipo ginecológico que las haga rechazables como donantes. Para concretar la fecha de sincronización nos debemos atener lo más posible al ciclo del animal, siempre que no haya por medio días festivos u otros eventos que nos afecten. Así pues los animales que hayan presentado celos muy cercanos en el tiempo (dispersión < 7 días) se dejen y los celos de los animales restantes se sincronizan, ya sea mediante una prolongación del ciclo con progestágenos (dispositivo intravaginal, implantes subcutáneos) o acortando el mismo mediante prostaglandina F2a. Es aconsejable administrar HCG o GnRH durante el celo para inducir la ovulación o estabilizar el ciclo (Gorlach, 1997).

2.6. SUPEROVULACIÓN.

El objetivo de los tratamientos superovulatorios en las vacas es obtener el máximo de embriones fertilizados y de la calidad transferible con alta probabilidad de producir gestaciones. Sin embargo la sincronía ovárica y las variaciones en las respuestas al tratamiento utilizado para la súper estimulación ovárica, es el principal factor limitante en la transferencia embrionaria para obtener una mejor producción de embriones transferibles para hacer costeable esta práctica (Lammoglia, 2010).

La superovulación consiste en la estimulación hormonal de la donante para la formación y desarrollo de varios folículos y su ovulación en ambos ovarios en un momento previamente fijado (Gorlach, 1997).

Existen varios ejemplos de las respuestas superovulatorias de revisiones de programas experimentales y comerciales de transferencia embrionaria

y su reporte incluye el ganado de carne 6.2 embriones transferibles colectados de cada vaca donadora; sin embargo, 24% de las colectas no producen embriones viables, 64% de las donadoras producen pocos embriones transferibles y solo el 30% de las colectas o lavados producen 70% de los embriones. Estos resultados reportados, revelan que existe un alto grado de valores impredecibles en la respuesta superovulatoria. El control de las ondas foliculares presenta una nueva alternativa y una nueva luz para mejorar y reducir estas variaciones (Lammoglia, 2010).

Una condición esencial para obtener éxito en la superovulación es aplicar la hormona en el instante adecuado. En el momento de la inducción de la superovulación, entre el día 8 y 14 del ciclo, debe poderse diagnosticar claramente por vía rectal un cuerpo lúteo. El diagnóstico se puede comprobar en casos dudosos, mediante la determinación del nivel de progesterona. Para ello se debe tomar una primera muestra de leche del día del último de celo superovulativo y una segunda antes de la inducción de la superovulación. La amplitud del pico de progesterona que se sucede normalmente tras el celo se tomara en cuenta a la hora de decidir si se procede o no la superovulación. Durante el estro los niveles de progesterona en la leche alcanza valores siempre $<0,3$ ng mientras que en diestro (momento donde se induce la superovulación) se ven, como mínimo, triplicados (Gorlach, 1997).

La superovulación (SPO) es un área que requiere estricta atención y cuidado. Las investigaciones realizadas en los últimos años no han podido solucionar todavía la variabilidad de la respuesta superovulatoria de la vaca. Tradicionalmente se dice que las donantes van a responder si la superovulación se inicia entre los días 8 y 14 del ciclo estral. La experiencia nos indica que los días 8, 9 y 10 del ciclo son los más propicios para iniciar los tratamientos SPO, debido a que en estos días se produce el comienzo de la segunda onda de desarrollo folicular (Lammoglia, 2010).

La vaca donante recibe una dosis luteolítica de PGF a las 48h de comenzado el tratamiento superovulatorio con gonadotrofinas y regularmente presenta celo a las 36 a 48 horas después de aplicada la PGF_{2a}.

Las receptoras deberán ser tratadas con PGF_{2a} de 18 a 24 h antes que las donantes, de manera que el estro se presente en forma sincrónica entre ellas. Es aconsejable detectar el celo de las receptoras desde las 12 a 24h después de la administración de PGF_{2a}, y las donantes desde las 36 h post - PGF_{2a} (Lammoglia, 2010).

Normalmente, las vacas donadoras entraran en celo a las 36 a 48 h post - PGF_{2a}, pero si hay signos de celo se realizan las inseminaciones a las 60 y 72 h post - PGF_{2a}. En nuestra experiencia, vacas que entran en celo un día más tarde, deben ser re-inseminadas pero normalmente van a dar una respuesta pobre (uno o dos CL). Por el contrario, las que expresan celo en el momento esperado o un poco antes va a tener una respuesta aceptable. Por lo general, cuando los signos de celo se presentan antes de lo previsto (no más de 24h), las inyecciones se pueden suspender y se realiza la Inseminación Artificial (IA) a las 12 y 24 h de iniciado el estro (Lammoglia, 2010).

Hay desacuerdo en cuanto al número de inseminaciones y la cantidad de semen requerido. Algunos grupos recomiendan el uso de dos dosis de semen en cada inseminación. A su vez, otros no han encontrado diferencia y han indicado que una sola inseminación a las 18 o 24 h post – celo es suficiente. El procedimiento de elección es la detección de celo e inseminación con semen de buena calidad a las 12 y 24 h post-celo ó 60 a 72 horas post - PGF_{2a} (Lammoglia, 2010).

Algunos trabajos recomiendan el uso de GnRH, LH, HCG durante el estro. Estos tratamientos han demostrado ser de utilidad en vacas donantes con problemas en la ovulación (vacas que han estado con quistes foliculares,

o vacas con gran cantidad de folículos anovulatorios en tratamientos previos, etc.). Pero no se ha encontrado ningún beneficio en su utilización de forma rutinaria (Lammoglia, 2010).

2.6.1. Gonadotropinas.

Las gonadotropinas más utilizadas en la actualidad son: 1) Extractos de pituitaria conteniendo FSH y LH; 2) gonadotropina coriónica equina (eCG), también llamada PMSG; y 3) gonadotropina menopáusica humana (hMG) (Lammoglia, 2010).

2.6.1.1. Extractos de hipófisis anterior:

a) Ovagen (ICP, New Zeland) FHS

Purificada de origen ovino. El envase contiene 17.6 mg. NIADDK-FSHo, equivalentes a 20 UI de NIH-FSF-S1 (Lammoglia, 2010).

b) Folltropin-V (Vetrepharm Inc., Canada).

El folltropin-V es un extracto pituitario porcino al que se le ha extraído aproximadamente el 80% de la LH. Se presenta en envases conteniendo un equivalente a 700 UI de FSH, en 20 ml de diluyente. Puede ser administrado tanto en esquemas con dosis decrecientes como constantes, durante 4 o 5 días). Se inyecta PGF_{2a} a las 48 h (tratamiento de 4 días) o las 72 horas (tratamiento de 5 días) de iniciado el tratamiento, sin existir cambios significativos en la respuesta superovulatoria (Lammoglia, 2010).

c) Pluset (Calier, España) Es un extracto pituitario porcino con una relación 1:1 entre FSH/LH. El envase contiene 2 frascos con 500 UI de FSH y LH cada uno, y 20 ml de disolvente (Lammoglia, 2010).

- d) Stimufol (Merial, Francia): FSH purificada conteniendo 500 mg de FSH y 100 mg de LH, y 10 ml de disolvente (10 mg equivalen a 1mg de NIDDKD-FSHp) (Lammoglia, 2010).

2.6.2. Dosis de FSH.

Este es un tema con mucha controversia debido a que existe una gran diversidad en el número de embriones viables obtenidos por cada lavado. Parte de la variabilidad en el número de embriones colectados depende de la calidad de dosis de FSH utilizada, y también puede ser afectada por la raza, estado productivo y edad del animal. La dosis inicial que se utiliza para el ganado *Bos Taurus* en un protocolo de superovulación es de 400 mg de FSH utilizando el producto Folltropin-V. (cuadro 1)

Cuadro 1. Dosis de FSH en ganado adulto *Bos Taurus* (Gorlach, 1997).

DIA	AM	PM	TOTAL
1	80 mg (4.0 ml)	80 mg (4.0 ml)	160 mg (8.0 ml)
2	60 mg (3.0 ml)	60 mg (3.0 ml)	120 mg (6.0 ml)
3	40 mg (2.0 ml)	40 mg (2.0 ml)	80 mg (4.0 ml)
4	20 mg (1.0 ml)	20 mg (1.0 ml)	40 mg (2.0 ml)
TOTAL	200 mg (10 ml)	200 mg (10 ml)	400 mg (20 ml)

Existen razas como la Simental, Fleckvieh, Montbeliarde y algunas cebuinas (Nelore) que son sumamente sensibles a la hormona folículo estimulante (FSH) y son necesarias dosis muy bajas para una mejor respuesta ya que dosis elevadas producen malos resultados debido a una sobre estimulación ovárica. La dosis inicial recomendada para estas razas es de 240 mg de FSH repartido en dosis descendente por cuatro días am-pm (cuadro 2) (Gorlach, 1997).

Cuadro 2. Dosis de FSH en ganado con hipersensibilidad (Gorlach, 1997).

DIA	AM	PM	TOTAL
1	50 mg (2.5 ml)	50 mg (2.5 ml)	100 mg (5.0 ml)
2	40 mg (2.0 ml)	40 mg (2.0 ml)	80 mg (4.0 ml)
3	20 mg (1.0 ml)	20 mg (1.0 ml)	40 mg (2.0 ml)
4	10 mg (0.5 ml)	10 mg (0.5 ml)	20 mg (1.0 ml)
TOTAL	120 mg (6.0 ml)	120 mg (6.0 ml)	240 mg (12.0 ml)

Las donadoras jóvenes son muy sensibles a la FSH y es recomendable iniciarlas con una dosis baja. Se recomienda iniciar becerras jóvenes con 200 mg o 240 mg de FSH. Después del primer lavado con la dosis inicial se debe valorar la respuesta de la donadora. Si la respuesta fue favorable se queda la dosis donde utilizada. Si la respuesta no fue favorable hay dos maneras de solucionarlo en el próximo lavado:

- a) Si la donadora se sobre estimulo se necesita bajar la dosis dependiendo de la respuesta. Si tenía más de 15 Cuerpos Lúteos (CLs) en cada ovario se puede reducir hasta 100 mg en el protocolo de FSH. Si fue menor a 15 CLs por ovario se puede reducir solo 50 mg, ya que es común que en vacas sobre estimuladas se encuentren en la colecta de embriones un gran número de óvulos o muy pocos embriones. Es posible también no encontrar óvulos ni embriones en vacas muy sobre estimuladas.
- b) Si la donadora tuvo muy baja respuesta en cuanto al número de CLs y embriones encontrados se puede aumentar la dosis. Si fueron menos de 3 embriones se puede subir la dosis hasta 100 mg si fueron cerca de 5 embriones subirla a 60 mg (Lammoglia, 2010).



Cuadro 3. Dosis de Folltropin-V para diferentes razas, pesos y edades en ganado bovino (Gorlach, 1997).

DOSIS	TIPOS DE GANADO
14 a 20 mg	Novillas
20 a 24,5 mg	Novillas y ganado cebuino.
30 mg	Vacas adultas (holstein)
35 mg	Vacas adultas muy grandes y pesadas

Debido a la vida media tan corta de FSH en protocolos de superovulación se han desarrollado protocolos de tratamientos con dosis decrecientes del preparado. El día 4 tras el comienzo del tratamiento se aplican, independientemente del tipo FSH utilizado, dos dosis de prostaglandina F2a (una por la mañana otra por la tarde) para la inducción del celo. Las dosis de los diferentes productos de FSH en mg pueden llevar a malentendidos y no son directamente comparables. Se dan referidos siempre a unos valores estándar del productor, lo que significa que, en realidad que, el dato de los mg no nos dice nada directamente sobre la actividad del mismo. Por ello se han reunido una tabla anterior los datos en ml de las dosis aconsejadas de los productos de FSH más usuales. Estos valores son efectivos siempre y cuando se cumplan la condición de haber diluido la totalidad del extracto liofilizado en todo el volumen de diluyente (Gorlach, 1997).

Cuadro 4. Tratamiento de superovulación con diferentes productos.

Productos	Días							
	1° Día tratamiento		2° Día tratamiento		3° Día tratamiento		4° Día tratamiento	
	Mañana	Tarde	Mañana	Tarde	Mañana	Tarde	Mañana	Tarde
FSH-P (Schering-Plough Animal Health)	2,0	2,0	1,5	1,5	1,0	1,0	0,5	0,5
	1,5	1,5	1,0	1,0	0,5	0,5	0,3	0,3
Folltropin - V (Vetrepharm, Canada Inc.)	3,0	3,0	2,5	2,5	2,5	2,5	2,0	2,0
	2,5	2,5	2,0	2,0	1,5	1,5	1,0	1,0
Ovagen TM(ICP, Nueva Zelanda)	3,5	3,5	2,5	2,5	1,5	1,5	1,0	1,0
	2,5	2,5	2,0	2,0	1,0	1,0	0,5	0,5
OvasetFSH-LH Sanofi-Cefa	6,0	6,0	5,0	5,0	3,0	3,0	2,0	2,0
	4,5	4,5	3,5	3,5	2,5	2,5	1,5	1,5

Todos los valores se dan en ml del producto ya disuelto.

Los valores en cursiva son válidos para novillas.

2.6.2.1. FSH-P.

a) **Presentación del Producto:** Folltropin-V

b) Descripción: Es un extracto liofilizado de folitropina altamente purificado, obtenido por selección cuidadosa de glándulas pituitarias porcinas.

c) Composición: FSH liofilizada, (equivalente a NIH): 400 mg.
Excipientes c.s.p.: 20 ml.

- d) **Acción:** Hormonal. Foliculoestimulante. FSH-Superoovulación.
- e) **Indicaciones:** Para inducir la superovulación en vacas y vaquillonas aptas para la reproducción.
- f) **Contraindicaciones y Advertencias:** Reconstituya el producto usando estrictas medidas asépticas, use jeringas y agujas estériles para todas sus inyecciones. No usar este producto en cerdas.
- g) **Dosificación:** Administre 2,5 ml. (50mg) por inyección intramuscular dos veces al día durante cuatro días. Observaciones: Previamente a la colecta de los óvulos fertilizados producto de la superovulación de estos animales, el estro tendrá que ser inducido con prostaglandina F2 o una prostaglandina análoga a la F2 alfa. Administre la prostaglandina F2 alfa o su análogo conforme las instrucciones del fabricante. Conjuntamente con la inyección número 6 de Folltropin-V a manera de inducir el estro para el apareamiento o inseminación.
- h) **Presentación:** Frasco-ampolla reconstituible con 20 ml.
- i) **Restricciones de Uso:** No sacrificar animales para consumo humano en los diez días siguientes a la última inyección de Folltropin-V (Sintex, 2012).

2.6.3. Gonadotropina Coriónica Equina (eCG).

2.6.3.1. Origen. Hace sesenta años, Cole y Hart informó que el suero tomadas de 62 yeguas en las distintas etapas del embarazo se inyectaron en ratas y ratones inmaduros estimulando el crecimiento del ovario. El suero recogido de yeguas antes de 37 días de embarazo no tuvo ningún efecto, mientras que el suero recogido entre los días 37 y 42 indujeron una respuesta gonadal pronunciada. La estimulación máxima producida por el suero tomado entre los días 43 y 80 días de gestación de la yegua, y los efectos puede ser inducida por suero recogido a través de 131 días. Hubo poca actividad para los días restantes 210 de gestación. El elemento que estimula los ovarios se conocía como PMSG. Se asumió que será producida por la glándula pituitaria equino, pero su localización en los tejidos fetales y maternos llevó Catchpole y Lyons para concluir que fue secretada por el corion y se almacenan en el endometrio. Posteriormente se ha demostrado que el sitio de síntesis de esta gonadotropina era las copas endometriales, que son placas pálidas, circunscritos de tejido que se desarrollan en el cuerno grávido del endometrio de la yegua, adyacentes a la faja coriónica del embrión (Bruce Murphy & Susan Martinuk, 1991).

2.6.3.2. Mecanismo de acción. La Gonadotrofina Coriónica Equina (eCG) desde el punto de vista farmacodinámico tiene una actividad semejante a las hormonas folículo estimulante y luteinizante (FSH y LH, respectivamente). Tiene una vida media de aproximadamente 2 días en la vaca y persiste por más de 10 días en la circulación sanguínea (Baruselli, Filho, Martins, Sales, & Ferreira, 2010).

La eCG administrada algunas horas previas a la ovulación estimula el crecimiento folicular debido a que tiene la capacidad de unirse e incrementar el número de receptores de FSH y LH de los folículos,

aumentando el tamaño del folículo preovulatorio, incrementando las concentraciones plasmáticas de progesterona luego de la ovulación, mejorando así el desarrollo embrionario y el mantenimiento de la preñez (Mapleoft, Carballo Guerrero, Taurus, & Bo, 2009).

La eCG se utiliza comúnmente en la sincronización del estro con la finalidad de incrementar la tasa de la ovulación, también permite estimular el crecimiento folicular (Mattos, 2010).

La eCG es una glicoproteína compleja con actividad de FSH y de LH. Tiene una vida media aproximadamente de 40 horas en la vaca y persiste por más de 10 días en la circulación sanguínea. Por esta razón, normalmente se administra en una sola dosis, seguida por PGF2a 48h después. La prolongada vida media de la eCG provoca algunos problemas originados por la permanente estimulación ovárica: como folículos que no ovulan, perfiles endócrinos anormales (altos niveles de estrógeno) y embriones de mala calidad (Manoel F. Sá Filho, 2009).

Estos problemas se contrarrestan en gran medida con la administración de antisuero-eCG o anticuerpos monoclonales anti-eCG en el momento de la primera inseminación. La dosis de eCG recomendada oscilan entre 1500 a 3000 UI por animal, usándose generalmente 2500 UI en una inyección intramuscular. La PMSG es producida por varios laboratorios, el más popular es Intervet (Fuentes, 2005).

2.6.3.3. Presentación del producto:

a) Nombre: Folligon

b) Composición: es una gonadotropina sérica de yegua preñada (eCG) con actividad de la hormona folículo estimulante (FSH) en forma de polvo cristalino liofilizado. En hembras aumenta la actividad ovárica, lo que permite mejorar la fertilidad, estimular el

crecimiento y maduración de los folículos. Cada frasco contiene eCG 1000 U.I.

- c) Indicaciones:** Para uso en bovinos, ovinos, caprinos, ovejas y perras. Folligon ejerce una influencia estimulante sobre las gónadas de los animales de ambos sexos. En las hembras folligon, estimula el crecimiento de los folículos por lo que esta preparación puede ser usada en casos de inactividad ovárica y para el tratamiento de superovulación. En los machos Folligon estimula la espermatogénesis actuando sobre los túbulos seminíferos.
- d) Dosis y modo de aplicación:** Aplique por vía intramuscular o subcutánea Vacas 500-1000 U.I: Anestro/inducción de celo; 1500-3000 U.I. Superovulación.; 500 U.I Mejora la tasa de fertilidad después de un tratamiento con progestágeno. Toros:1500 – 3000 U.I Dos veces a la semana durante 4 a 6 semanas.
- e) Precauciones:**
En caso de reacción anafiláctica aplicar adrenalina (1:1000) o glucocorticoides.
Una vez reconstituido el producto se deberá usar en las 12 horas siguientes. Manténgase entre 5-8 °C de temperatura y protegido de la luz.
- f) Presentación:** Caja con 5 frascos de 1000 U.I más 5 diluyentes de 5 ml cada uno.
- g) Retiro:** Ninguno. (MSD Salud Animal, 2012)

2.6.3.4. Utilización de eCG en las etapas finales del tratamiento superestimulatorio.

Desde hace un tiempo se ha comenzado a especular sobre la necesidad de la FSH y LH de los folículos en crecimiento durante un tratamiento superestimulatorio. Basados en los conocimientos de la fisiología del

desarrollo folicular, los folículos en desarrollo necesitan principalmente FSH durante la fase de reclutamiento hasta llegar a un tamaño de 8,5 mm de diámetro en la vaca *Bos taurus* y 6,2 mm en la vaca *Bos indicus*. Después de ese tamaño, el folículo dominante adquiere receptores de LH en las células de la granulosa y se dice que su crecimiento hasta la ovulación pasa a ser LH dependiente. (Barros & Barcelos, 2008)

Por lo tanto, los folículos de vacas superestimuladas podrían beneficiarse con la inclusión de una mayor cantidad de LH al final del tratamiento. El autor Price. et al trataron de aumentar los pulsos de LH mediante aplicaciones frecuentes de GnRH. A pesar de conseguir un aumento de la producción de estradiol por parte de los folículos en crecimiento, las donantes no ovularon después de una inyección de GnRH al final de la superestimulación, tal vez porque el tratamiento frecuente produjo una desensibilización de la hipófisis a la GnRH. (Maplefoft, Carballo Guerrero, Taurus, & Bo, 2009)

Otra opción podría ser utilizar eCG al final de un tratamiento convencional con FSH. La eCG tiene actividad similar a la FSH y LH y al tener una vida media larga (40 h) podría dar un estímulo constante a los receptores de LH de los folículos en crecimiento. Barros et al realizaron un experimento donde evaluaron la respuesta superovulatoria en vacas donantes Nelore que fueron superestimuladas con Folltropin-V durante los primeros tres días de tratamiento y a las cuales se les reemplazó las inyecciones de FSH correspondientes al cuarto día, por dos inyecciones (cada 12 h) de 200 UI de eCG cada una. Las donantes del Grupo Control fueron superestimuladas con el tratamiento convencional de 8 dosis decrecientes de FSH cada 12 h y por 4 días. El tratamiento con eCG incrementó significativamente ($P < 0,03$) el número de ovocitos/embriones colectados ($10,0 \pm 1,5$ vs $6,7 \pm 1,2$ para las tratadas con eCG y las del Grupo Control, respectivamente) y solo numéricamente el número de

embriones transferibles ($7,3 \pm 1,2$ vs $5,1 \pm 1,1$ para las tratadas con eCG y las del Grupo Control, respectivamente) (Barros & Barcelos, 2008).

2.7. TRATAMIENTOS DE SUPEROVULACIÓN.

Al plantearse realizar un tratamiento superovulatorio a una donante son muchos los factores que hay que tener en cuenta, desde la raza, la edad, es estado fisiológico, el intervalo post parto, la condición corporal, etc.; además de otros factores ligados al rebaño, como el manejo, el estrés y el ganadero. Por esto existen numerosos protocolos de tratamiento superovulatorios sobre la base de diferentes hormonas gonadotrofinas, sus utilizaciones solas o acompañadas por progestágenos u otras hormonas y así serán su duración y su efectividad (Sá Filho, y otros, 2010).

Ninguno de los tratamientos ni de las hormonas garantiza una respuesta satisfactoria en todos los casos, así pues la elección del protocolo, hormona y dosis, dependerá del animal en cuestión y de sus circunstancias particulares (Baruselli, Filho, Martins, Sales, & Ferreira, 2010).

Para favorecer la respuesta superovulatoria en cuanto a la cantidad y calidad de los embriones obtenidos es importante eliminar el folículo dominante al inicio del tratamiento, bien sea por medios mecánicos mediante su punción, su aspiración o por la ablación de la totalidad de los folículos presentes en los ovarios mediante un ecógrafo, o por medios farmacológicos, que mediante la administración, estrógenos, en especial el 17B estradiol y el benzoato de estradiol, inducen la regresión del folículo dominante al comienzo de su actividad. Otros estrógenos como el cipionato de estradiol están en estudio (Sá Filho, y otros, 2010).

Algunos de los protocolos de superovulación se describen a continuación:

Cuadro 5. Tratamientos de superovulatorios tradicionales (Barruselli, 2010).

Días	Donadoras				Receptoras
	PMSG		FSH		
	AM	PM	AM	PM	
0	2500 UI		FSH	FSH	
1					PGF2a
2	PGF2a		FSH +	FSH	
			PGF2a		
3			FSH	FSH	
4	CELO	IA + Neutra PMSG	CELO	IA	Observar celos
5	IA		IA		
11	COLECTA		COLECTA		TRANSFERENCIA

Cuadro 6. Tratamiento tradicional de superovulación con dispositivos de liberación de progesterona y 17B estradiol o Benzoato de Estradiol (Barruselli, 2010).

DONADORAS		RECEPTO RAS	DIAS	DONADORAS		RECEPTO RAS
DIA	Ecg	FSH		eCG	FSH	
0	AM: Progestágeno + P4 (IM) + 5mg de E2		0	AM: Progestágeno + P4 (IM) + 5mg de E2		
4	AM: eCG (2500 UI)	AM: FSH PM: FSH	5	AM: eCG (2500 UI)	AM: FSH PM: FSH	
5		AM: FSH PM: FSH	6	AM: eCG (2500 UI)	AM: FSH PM: FSH	AM:PGF2a
6	AM: PGF2a PM: retirar progestáno	AM: FSH + PGF2a PM: FSH + retirar progestáno	7	AM: PGF2a PM: retirar progestáno	AM: FSH + PGF2a PM: FSH + retirar progestáno	
7		AM: FSH PM:FSH	8		AM: FSH PM:FSH	
8	AM: celo + IA PM: IA + neutra – eCG	AM: celo + IA PM: IA.	9	AM: celo + IA PM: IA + neutra - eCG	AM: celo + IA PM: IA.	AM: observar celos
9	AM: IA	AM: IA	10	AM: IA	AM: IA	
15	Colecta	Colecta	16	Colecta	Colecta	Transferencia

Si se usan progestágenos, los más habituales son: CRESTAR, PRID, CIDR-B. SE denomina Día 0 al día en que el progestágeno es colocado, sin importar en que día del ciclo en que se encuentre la donante (Baruselli, Filho, Martins, Sales, & Ferreira, 2010).

2.7.1. Protocolo Brasileiro de Superovulación.

Esté protocolo propuesto por Baruselli es similar a los anteriores. Sin embargo, se han desarrollado para inseminar las donadoras a tiempo fijo, es decir no hay necesidades de detectar celos por lo que lo hace probablemente el más práctico de todos los protocolos. Baruselli reportó 9,983 lavados utilizando el protocolo a tiempo fijo con promedio de 5,6 embriones transferibles por lavado (Sá Filho, y otros, 2010).

Cuadro 7. Protocolo brasileiro para superovulación en ganado bovino (Barruselli, 2010).

DIA	MAÑANA	TARDE
0	Implante + benzoato de estradiol (2mg) + progesterona (50mg)	
4	FSH	FSH
5	FSH	FSH
6	FSH +PGF2a	FSH + PGF2a
7	FSH	FSH + Remover el implante
8	LH o GnRH	IATF
9	IATF	
15	LAVADO	

2.7.2. Protocolo Combo para Superovulación.

Este protocolo es una combinación de varias hormonas auxiliares en reproducción. Por ejemplo se incorpora la utilización de la hormona llamada somatotropina bovina Recombinante conocida comercialmente con el nombre de Lactotropina (500mg; Elanco) o Boostin (Schering-plough; G320 mg y S 500 mg. La idea de usar somatotropina bovina es incrementar la respuesta folicular a la hormona FHS. Este protocolo también manipula el ciclo estral bovino para inducir las donadoras a un

primer calor que se conoce como calor base. Cuatro días después del calor base se aplica somatotropina bovina, dos días después se aplica estradiol 17B (5mg), progesterona (50mg) y se pone el dispositivo de progesterona. El día 10 del ciclo se inicia el protocolo de FSH que termina el día 13 del ciclo inyectando FSH y PGF2a am y pm (Mapletof, 2002).

Además en la última inyección de FSH y PGF2 también retira el implante. El calor se manifiesta generalmente a las 36 horas de retirar el implante. Es recomendable palpar los ovarios de las donadoras el día 9 del ciclo estral a partir del calor base o un día antes de iniciar el protocolo de FSH. Esto es por si alguna de las donadoras presentó un calor falso como calor base quedará fuera del programa y de esta manera se garantiza más la respuesta de las donadoras. (Mapletof, 2002)

Cuadro 8. Protocolo combo para superovulación en ganado bovino.

DIA	MAÑANA	TARDE
0	Implante + estradiol 17B + PGF2a	
7	Retirar el implante + PGF2a	
8	2.5 mg Estradiol 17B	
13	Somatotropina	
15	Implante + Estradiol 17B(5 mg) +Progesterona 50mg	
19	FSH	FSH
20	FSH	FSH
21	FSH	FSH
22	FHS + PGF2a	FSH + PGF2a + Remover Implante
24	Celo IA una dosis	Celo IA dos dosis
25	IA una Dosis	
32	Lavado	



Recientemente se están ensayando con buenos resultados la simplificación de los tratamientos, reduciendo el número de inyecciones de FSH a dos (dosis partida) o una sola, administrada bajo la escápula (en animales en buen estado de carnes) o vehiculada en PVP, aceites, etc., incluso puede ser expandida por pequeñas bombas osmóticas subcutáneas. A pesar de los recientes e importantes avances logrados en el campo de la fisiología reproductiva del bovino, los factores inherentes al animal donante sólo están parcialmente aclarados. Otros factores son el estado nutricional, la historia reproductiva, la edad, la estación del año, la raza, el estado ovárico en el momento del tratamiento y efecto de repetición de tratamientos superovulatorios. Atendiendo a todo esto se puede simplificar los procedimientos, mejorar las respuestas y reducir la variabilidad (Lammoglia, 2010).

2.8. TECNICA DE COLECCIÓN DE EMBRIONES.

En el año 1976 fueron publicadas tres técnicas no quirúrgicas de recuperación de embriones al mismo tiempo. Desde entonces estas técnicas han sufrido modificaciones, pero la base sigue siendo la misma: Introducción de una sonda a través de la vagina hasta su ubicación en el útero y la introducción de un medio de lavado apropiado para el útero y su recuperación posterior. Debe tenerse presente que estas técnicas no quirúrgicas pueden ser usadas cuando los embriones se encuentran en el útero, generalmente los 6-8 días después del estro. (Seidel G. , 1991)

En la actualidad existe básicamente una técnica no quirúrgica de colección de embriones con dos modalidades o métodos diferentes:

- a) Recuperación por gravedad con circuito cerrado y circulación.
 - b) Recuperación por aspiración interrumpida (método de la jeringa)
- (Avila, 2009).

Entre de estas variables se detallan infinidad de variables, combinaciones, adaptaciones, etc. Cada técnico tiene su propio método. Lo importante en la colección es el éxito que se obtenga al aplicarla y este se traduce en la obtención de un alto porcentaje de embriones con referencia al número de ovulaciones. El técnico que la realiza debe sentirse seguro y cómodo, la técnica empleada no debe causar daño a la donante (Gorlach, 1997).

Se ubica la vaca donante en una manga y se evacua las heces del recto. A la vaca se le aplica la anestesia epidural (xilocaína 2%). Es importante no comenzar el trabajo de colección de embriones sin tener la seguridad de que la anestesia haya tenido efecto. Se lava la región perineal y labios vulvares con agua y jabón desinfectante y se seca el área. La cola se amarra a un costado de la donante. Existen básicamente tres clases de catéteres para la colección no quirúrgica: Foley de dos vías, Foley de tres vías, y el modelo Neustadt/Aisch (Rush). Todos los catéteres tienen un

globo en un extremo, que se puede inflar y sirve para fijar la sonda al cuerno uterino y cerrar el extremo distal de este catéter. También existen distintos grosores, para usarlos en vacas o novillas. Los catéteres más usados son los Foley de dos vías y las Rush. Los catéteres de Foley son fáciles de encontrar en el comercio y son relativamente baratos. Tienen algunos inconvenientes para usarlos en colección de embriones debido a que son blandos y cortos (sobre todo cuando se usan en vacas grandes). Miden 40cm de largo, el extremo entre el globo y la punta mide 3cm y presentan dos orificios; actualmente las casas especializadas ya ofrecen sondas Foley largas y otras desechables de silicona (Gorlach, 1997).

Una vez pasado el cérvix el catéter es llevado directamente a uno de los cuernos, es recomendable seguir siempre la misma rutina, para evitar errores, por lo que empezaremos siempre por el mismo cuerno, y una vez lavado pasaremos al otro. Cuando ya esté colocado en el cuerno, el estilete es retirado 2 o 3 cm y el catéter es empujado suavemente. Esta maniobra se repite hasta que la punta del catéter este en la posición deseada (mitad del cuerno o ligeramente más craneal). El balón es inflado inicialmente con 5ml de suero salino o aire o PBS, palpado y nuevamente inflado hasta que se sienta sujeto en el lumen uterino. Para esta maniobra es recomendable tensar el catéter para observar si hay deslizamiento. Si el balón es inflado rápidamente o sobreinflado puede romper el endometrio y causar hemorragia. El estilete es entonces removido totalmente y se coloca una pinza en el extremo posterior de la vía del balón del catéter para que este se desinfe (Gorlach, 1997).

Hasta este momento las maniobras son iguales para las modalidades de recuperación por gravedad y por aspiración (Avila, 2009).

2.8.1. Recuperación de embriones.

En la actualidad los embriones se recogen en filtros especiales tipo En-com existiendo diferentes marcas en el mercado; estos filtros permiten el paso de líquido pero no de embriones. Antiguamente se usaban frascos de plástico o cristal siliconado (Avila, 2009).

El PBS se puede comprar y su presentación existe en bolsas de uno a dos litros, o puede ser fabricado por uno mismo e introducido en bolsas para su posterior utilización, aunque también puede ser almacenado en botellas, pero es menos práctico (Avila, 2009).

La unión entre la bolsa que contiene el PBS y la sonda se realiza por medio de una tubería en forma de -Y-, un extremo está conectada a la bolsa, otro a la sonda y el otro al filtro tipo En-com. Muchos equipos interponen, en el extremo que va de la bolsa de PBS a la sonda, una válvula antireflujo que permite el paso del PBS en un solo sentido, siempre conectada a la válvula a una jeringa; este sistema facilita mucho el lavado y permite la recolección sin necesidad de estar permanentemente masajeando el cuerno uterino (Avila, 2009).

- a) Recuperación por gravedad con circuito cerrado: La sonda se coloca en el cuerno uterino que vamos a lavar, pudiendo colocarse muy profunda, o poco profunda; la cantidad de PBS que se ha de introducir cada vez es diferente según la colocación que hemos realizado. Cuando se usan válvulas anti-reflujo hay que tener permanentemente la mano introducida en el recto para saber cuándo se ha llenado el cuerpo uterino e interrumpir la entrada de PBS, se masajea ligeramente el cuerno y se procede a su extracción por gravedad. Si se usan estas válvulas y una colocación profunda de la sonda, se calcula la cantidad de PBS que cabe en el extremo distal del cuerno y se va introduciendo con

una jeringa, recuperándolo por gravedad, no siendo necesario permanecer con la mano en el recto (Avila, 2009).

- b) Recuperación por aspiración interrumpida: Algunos equipos introducen el PBS conectado directamente la sonda a una jeringa y aspirando con la misma jeringa, el PBS introducido, para una vez extraído, pasarlo a un filtro, depositarlo en frascos o directamente en placas Petri (Avila, 2009).

2.9. MEDIOS DE COLECCIÓN Y MANTENIMIENTO.

Un medio de cultivo de embriones ideal será aquel que se asemeje químicamente al medio en que se encontraban los embriones al momento de ser colectados. Los embriones mamíferos están altamente adaptados al medio uterino de la madre por lo que se hace imprescindible mantenerlos en condiciones óptimas. El pH debería mantenerse a 7.3 0.4, la osmolaridad (concentración de sales) en 285-300 miliosmoles/kg (De la fuente JA., 1992).

Existe una gran variedad de medios de cultivo, pero el más popular actualmente es el Dulbecco's Buffer Salino (PBS). Debido a que tiene fosfato (cuadro 9) como tampón su pH cambia en forma mínima al ser expuesto a la atmosfera, por lo que lo hace también un medio ideal para las condiciones de granja. Otros medios son el TCM-199, HMS F-10, MEM etc., todos tienen el inconveniente que su pH cambia fácilmente al ser expuesto a la atmosfera, ya que su tampón es el bicarbonato, por lo que deben mantenerse equilibrados con 50.5% CO₂ y 95% de aire. El medio que se utiliza para la colección de embriones es diferente en cuanto a los aditivos usados y las concentraciones de los mismos, frente al medio de mantenimiento (De la fuente JA., 1992).

Cuadro 9. Composición del medio Dulbecco's Fosfato Buffer Salino (PBS) para colección y mantenimiento de embriones.

COMPUESTO	COLECTA G/L	MANTENIMIENTO
NaCa	8.00	8.00
KCl	0.20	0.20
CaCl	0.10	0.10
MgCl	0.10	0.10
NaHPO (2H ₂ O)	1.15	1.15
KHPO	0.20	0.20
ADITIVOS		
Penicilina	100 UI	100 UI
Estreptomicina	100 ug	100 ug
Fungizona	25 ug	25 ug
Suero fetal *	1-2 %	1-2 %
Piruvato	0.33 mM	0.33 mM
Glucosa	1 mg	1 mg

*Otros sueros pueden ser: Suero de ternero recién nacido (NCS), albúmina sérica bovina (BSA) o suero de novillo (steer serum o donor serum). Todos deben ser inactivados por calor y estar libres de toxinas y agentes patógenos (De la fuente JA., 1992).

2.10. BÚSQUEDA Y MANIPULACIÓN DE LOS EMBRIONES.

Los embriones se buscaran a 10X o 15X aumentos. Actualmente se puede filtrar directamente todo el medio de colección utilizando filtros descartables estériles (Vet Concepts Spring Valley, USA). Finalizado el filtrado se lava el filtro con PBS utilizando una jeringa y aguja fina (22 G) y el fluido de lavado es colectado en una placa de Petri estéril para proceder a la búsqueda de embriones. Para mayor seguridad cada placa se repasa por dos veces más, después de encontrado el ultimo embrión. Finalizada cada búsqueda se realiza un movimiento rotativo con la placa para despegar algún posible embrión adherido a los bordes. A medida que se van encontrando los embriones se los va colocando en un aplaca de Petri pequeña que contiene el medio de mantenimiento (PBS + 10-20% FCS). Para cambiar a los embriones de placa se utiliza una micropipeta conectada a una jeringa de 1ml (de tuberculina) o un catéter estéril (Valencia, 2009).

Cuando la búsqueda se ha completado los embriones son evaluados y colocados en medio de mantenimiento fresco. Posteriormente son lavados al menos tres veces siendo preferible realizarlo 10 veces en medio estéril (Valencia, 2009).

Antes de ser transferidos los embriones son nuevamente colocados en un medio fresco. Si los embriones se van a conservar por más de 6h deberán ser colocados en medios de cultivo fresco dentro de un tubo de ensayo y almacenados en un termo o en un vaso con agua en el frigorífico (Valencia, 2009).

Si los embriones se van a conservar por más de 6h deberán ser colocados en medios de cultivo fresco dentro de un tubo de ensayo y almacenados en un termo o en un vaso con agua en el frigorífico. (Valencia, 2009).

2.11. IDENTIFICACIÓN DE LOS EMBRIONES.

El diámetro de un ovocito es de aproximadamente 140 – 170, incluyendo el grosor de la zona pelúcida. El diámetro del ovocito permanece prácticamente sin variación desde el estado de 1 célula hasta el estado de blastocito expandido (Palma, 2001).

El número de células de un embrión puede ser contado sin dificultad hasta el estado de 16 células. Hasta este estado los embriones se dividen geométricamente, después las células se dividen asincrónicamente y la individualización se hace dificultosa. Cuando el embrión alcanza el estado de 32 células se produce la compactación, en el cual los blastómeros pierden su forma esférica y comienza a adherirse entre ellos. En este estado el embrión recibe el nombre de MÓRULA (Palma, 2001).

Posteriormente, en el estadio de BLASTOCISTO, los blastómeros comienzan a diferenciarse dando origen a dos tipos de células, las células de trofoblasto y el macizo celular interno (MCI). Las primeras darán origen a la placenta y el MCI dará origen al feto. Es más fácil distinguir el MCI cuando el embrión se encuentra en el estado de Blastocisto expandido que en estadios anteriores (Palma, 2001).

La zona pelúcida refleja la luz del microscopio observándose como una estructura transparente. El color de los blastómeros es más oscuro que el debris celular y mucus que se encuentra en la placa, ya que los embriones tienden a adosarse a ella. La individualización de embriones de 8-10 días de edad es difícil ya que rompen la zona pelúcida, escapando de ella y el embrión puede ser confundido con grupos de células desprendidas del endometrio al momento del lavado (Palma, 2001).

2.11.1. Estadios de desarrollo del embrión.

Se identifican de acuerdo al desarrollo morfológico. Por ejemplo de 8 células, 16 células, por lo que reciben diferentes nombres:

- a) **MORULA:** Se asemeja a una mora. Los blastómeros son difíciles de discernir uno de otro. La masa de células (embrión) ocupa casi todo el espacio intrazonal (Edad estimada 5-6 días).
- b) **MÓRULA COMPACTA:** Los blastómeros se han juntado formando una masa compacta. El embrión ocupa el 60-70% del espacio intrazonal (edad estimada de 6 días).
- c) **BLASTOCISTO TEMPRANO:** Presenta una cavidad con fluido o blastocelo, dando la apariencia de un sello como anillo. El embrión ocupa 70-80% del espacio intrazonal. Se puede, en este estadio, comenzar a diferenciar en forma visual el trofoblasto y el macizo celular interno (edad estimada 7 días).
- d) **BLASTOCISTO:** presenta una diferencia clara entre el trofoblasto externo y el macizo celular interno (más oscuro). El blastocisto es identificado con claridad y el embrión ocupa casi todo el espacio intrazonal (edad estimada 7-8 días).
- e) **BLASTOCISTO EXPANDIDO:** El diámetro aumenta 1.2 a 1.5 veces. La zona pelúcida se adelgaza aproximadamente 1/3 del grosor original. Los embriones en este estadio se pueden encontrar colapsados (edad estimada 8-9 días).
- f) **BLASTOCISTO ECLOSIONADO:** En este estadio los embriones pueden estar el proceso o estar completamente fuera de la zona pelúcida. Los blastocistos eclosionados son esféricos con el blastocelo bien formado o colapsado. Es muy difícil en este estado la identificación del embrión por un operador inexperto (9-10 días) (Palma, 2001).

2.12. CLASIFICACIÓN DE LOS EMBRIONES.

Con la clasificación se pretende evaluar la calidad del embrión. Se clasifican en base a sus características morfológicas que lógicamente es subjetiva y dependerá muchas veces de la experiencia del operador. No hay duda que la viabilidad de los embriones solo se puede predecir evaluando la tasa de preñez obtenida después de ser transferidos (Palma, 2001)

Algunas de las características que se analizan para clasificar a los embriones se describen a continuación:

- a) Forma del embrión.
- b) Color y textura de la masa celular.
- c) Número y compactación de los blastómeros.
- d) Diferencia de tamaño entre blastómeros.
- e) Tamaño del espacio perivitelino.
- f) Presencia de blastómeros sueltos, degenerados o detritus celulares.
- g) Presencia, número y tamaño de vesículas (indican degeneración).
- h) Apariencia de la zona pelúcida (fracturas, etc.).

De acuerdo con estas pautas los embriones se clasifican en:

- a) EXCELENTE: El embrión ideal, simétrico, con células de tamaño, color y textura uniformes.
- b) BUENO: Pequeñas imperfecciones como algunos blastómeros sueltos, tamaño irregular o algunas vesículas.
- c) REGULAR: Problemas más definidos, incluyendo presencia de blastómeros sueltos, vesiculaciones o algunas células degeneradas.



- d) MALO: Problemas severos, Numerosos blastómeros sueltos, células degeneradas, células de distinto tamaño, numerosas vesículas.
- e) DEGENERADO: Blastómeros desorganizados y sueltos. Células de apariencia vesicular, granular o crecimiento retardado en relación con el resto de los embriones obtenidos.
- f) INFERTILIZADO: Pueden ser confundidos con una mórula. Apariencia granular, rodeado por una membrana vitelina lisa o en caso de estar rota, el punteado cubrirá completamente el espacio vitelino (Palma, 2001).

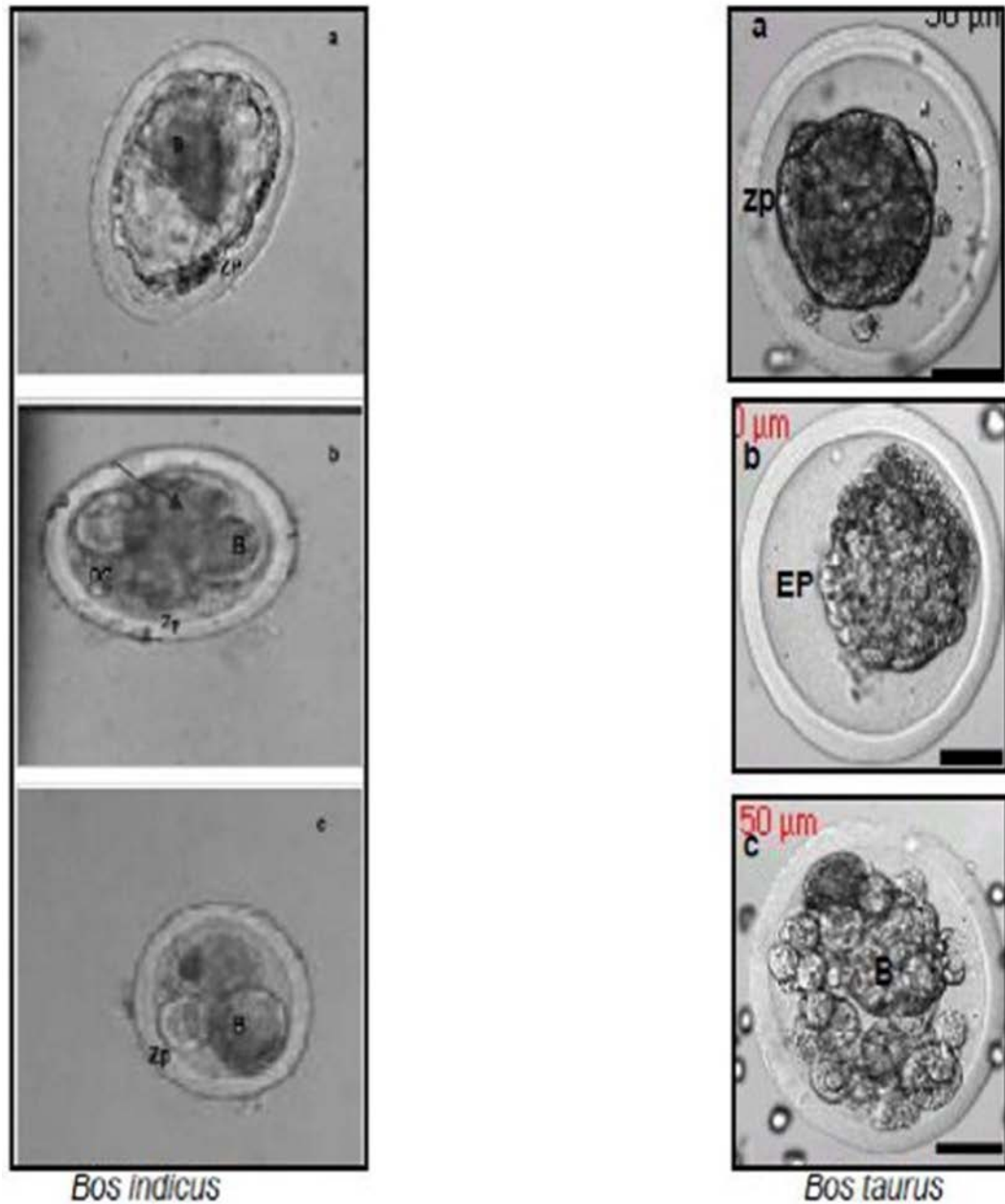


Figura 1. Embriones bovinos a) buenos, b) regulares y c) malos. ZP= Zona Pelúcida, DC= Detritus celulares; B= Blastómeros; Flecha indica la presencia de vesículas; EP= espacio perivitelino.

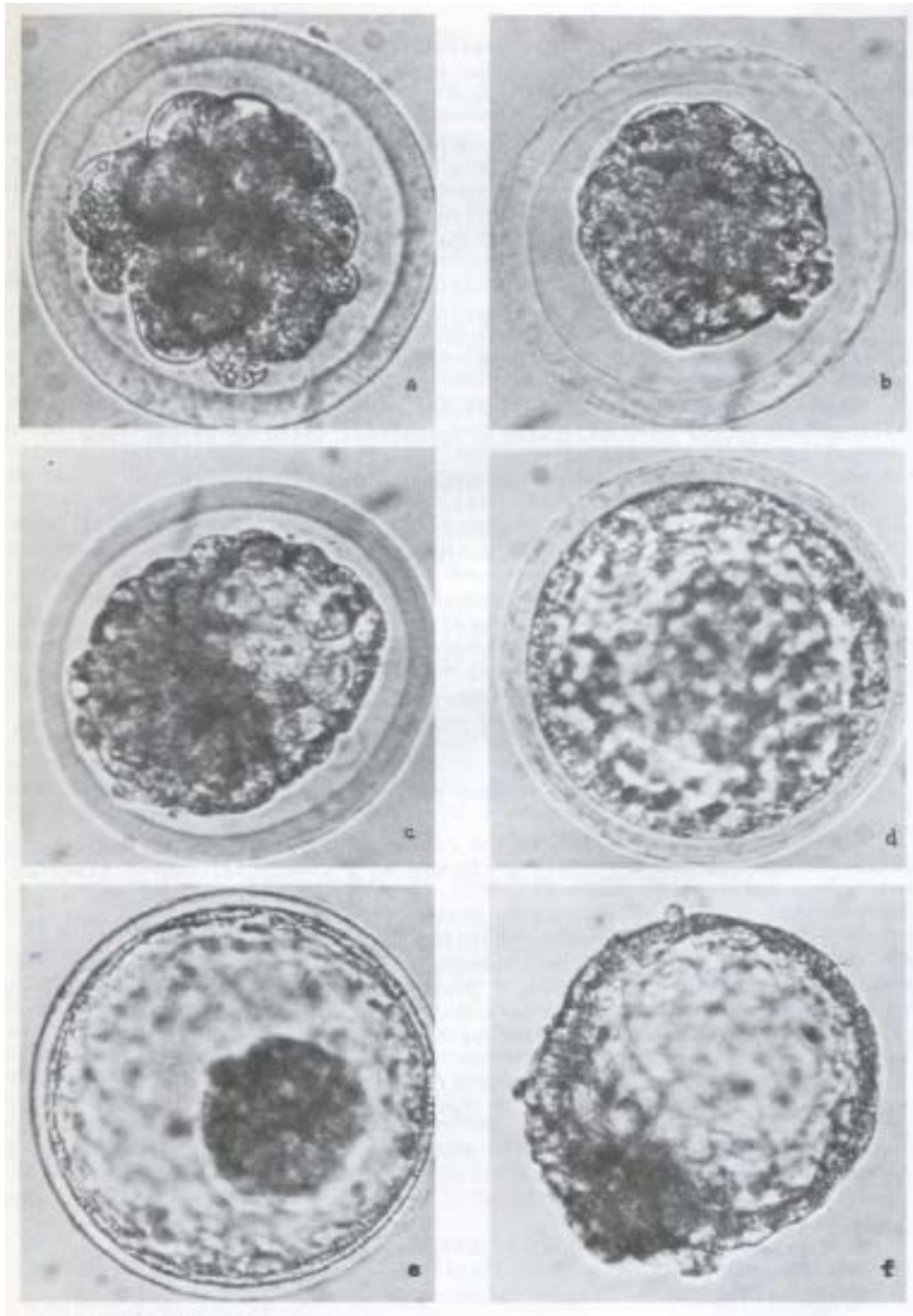


Figura 2. Mórula temprana (a); mórula compacta (b); blastocisto temprano (c); Blastocisto (c); blastocisto expandido (e) y blastocisto eclosionado (f).

Cuadro 10. Guía propuesta por la Asociación Internacional de Transferencia de Embriones (IETS, 2009).

Estado de desarrollo		Calidad Morfológica	
Númer	Etap	Número	Calidad
0	Infertilizado (ufos)	1	Excelentes
1	2 a12 células	2	Buenos
2	Mórula temprana	3	Regulares o
3	Mórula	4	Malos
4	Blastocisto temprano	5	Muertos o degenerados
5	Blastocisto		
6	Blastocisto expandido		
7	Blastocisto eclosionado		
8	Blastocisto eclosionado		
9	elongado		

Los embriones de calidad 1 son los mejores para congelar, los de calidad 2 pueden ser congelados con pobres resultados, pero aceptables para ser transferidos frescos. Los de calidad 3 tienen índice de preñes regulares y son raramente transferibles. (Valencia, 2009)

2.13. CONGELACION DE EMBRIONES.

La congelación de embriones tiene muchas aplicaciones en programas de trasplante embrionario, tales como la facilidad del manejo de las receptoras, reduciendo los costes. La época de partos puede ser programada, aun cuando la colección de las donantes y la congelación se realicen durante todo el año. Además, permite la importación y exportación de embriones y el testaje de enfermedades contagiosas mientras los embriones se tienen en cuarentena.

Otras ventajas son:

- a) Las receptoras no tienen que ser sincronizadas para el día de la colección.
- b) El parto puede ser programado para el periodo más adecuado, en el ganado de carne para el periodo de mejor y mayor cantidad de alimento.
- c) Los embriones congelados pueden ser transportados a larga distancia más fácilmente, a menor precio y con menor riesgo de transmisión de enfermedades que los animales vivos.
- d) Cuando se colecta una mayor cantidad de embriones de buena calidad que las receptoras disponibles los embriones excedentes pueden ser congelados para ser transferidos posteriormente.
- e) Se puede crear un banco de embriones con caracteres genéticos deseados para ser utilizados en tiempo y lugar elegidos (Valencia, 2009).

2.13.1. Principios Básicos.

La congelación de una célula viviente constituye un proceso físico-químico complejo de intercambio de calor y transporte de agua entre la célula y el medio que la rodea. Existe una velocidad de enfriamiento óptimo para cada tipo celular, dependiendo del tamaño de la célula, su relación de superficie/volumen, su permeabilidad al agua y el coeficiente de temperatura de esa permeabilidad. En el caso de la congelación de embriones, el objetivo principal es la viabilidad del embrión en las etapas de congelación y descongelación. Para ello debe respetarse la tasa de enfriamiento y evitar la formación de cristales que puedan llegar a destruir las células (Valencia, 2009).

Normalmente, el medio que contiene los embriones se enfría por debajo del punto de congelación sin la formación de cristales, este fenómeno se

llama superenfriamiento, y posteriormente (a una temperatura más baja) se forma el núcleo de congelación, seguido por la liberación del calor latente de fusión que produce un aumento de temperatura hasta la temperatura de cambio de estado. Para evitar este inconveniente la información del núcleo de congelación es inducida en el medio extracelular, alrededor de 2°C por debajo del punto de congelación del medio, proceso conocido como “seeding” o siembra (Valencia, 2009).

En la congelación controlada de embriones el embrión va sufriendo un proceso de deshidratación paulatina. El agua dentro del embrión y entre los cristales de hielo, no se congela a esta temperatura porque los solutos en el agua descienden el punto de congelación (Valencia, 2009).

En un mayor descenso de temperatura los cristales de hielo se agrandan, la concentración de solutos aumenta y los embriones responden osmóticamente perdiendo agua al medio extracelular aún no congelado.

Los embriones pueden ser dañados durante la congelación y descongelación, principalmente debido a los efectos de solución o a la formación de cristales intracelulares. Para evitar el daño, los embriones se deben congelar a temperaturas menores 1°C/min. Esto es, no tan rápido como para impedir la salida de agua con la consecuente formación de cristales intracelulares, ni tan lento como para que la excesiva concentración de sales afecte a los embriones (Valencia, 2009).

Los embriones normalmente se almacenan en nitrógeno líquido a -196°C. Las únicas reacciones que ocurren a esa temperatura son ionizaciones directas debidas a radiaciones de fondo. Consecuentemente, en un tiempo de almacenamiento de 200 años es improbable que afecte la supervivencia de los embriones congelados (Valencia, 2009).

2.13.2. Crioprotectores.

La función de los crioprotectores es la de proteger a las células de lesiones producidas por la congelación. Existen muchos tipos de crioprotectores, que se agrupan según la posibilidad de penetración o no de las membranas celulares. Así los crioprotectores permeables más utilizados: Glicerol, Dimetil sulfoxido (DMSO), Etilenglicol, 1.2 Propanediol. Los crioprotectores no permeables (que no atraviesan la membrana) más utilizados son: Sacarosa, Dextranos, Polivinil pirrolidona (PVP) (Valencia, 2009).

Se cree que los crioprotectores actúan reduciendo la cantidad de hielo presente a cualquier temperatura durante la congelación, moderando así los cambios en concentración de solutos. Un buen crioprotector debe tener alta solubilidad, baja toxicidad a altas concentraciones y un bajo peso molecular para lograr una mayor permeabilidad y para poder obtener el máximo efecto. Hace unos años, el glicerol era el crioprotector más utilizado en la congelación de embriones bovinos, actualmente el etilenglicol es el más usado ya que permite la transferencia directa, con un importante ahorro de costos.

Cuando el embrión se expone a las crioprotectoras inicialmente se contrae por la pérdida de agua a causa de la hiperosmolaridad de la solución extracelular y porque el embrión es más permeable al agua que al crioprotector. La contracción va a continuar hasta que el reflujo del agua es equilibrado por el influjo de crioprotector. El crioprotector entrará al embrión a una velocidad que dependerá del coeficiente de permeabilidad y la temperatura. Posteriormente el agua se re-introducirá a la célula, siendo el equilibrio completo cuando el volumen del agua de los embriones alcanza su volumen isotónico original (Valencia, 2009).

La respuesta ocurre cuando el crioprotector se extrae de la célula. Cuando la concentración del crioprotector disminuye inicialmente, el agua entrará al embrión y si la dilución no se lleva a cabo con cuidado, las células pueden dilatarse hasta un tamaño perjudicial.

Después de la congelación deberemos extraer el crioprotector del embrión. El método empírico es el de diluir paso a paso con PBS pipeteando los embriones por soluciones de concentración decreciente, por ejemplo en pasos de $-0.25M$. En realidad este procedimiento ha caído en desuso debido a su complejidad (Valencia, 2009).

Actualmente se utilizan solutos no permeables como la sacarosa, en el medio de dilución que debe tener un volumen 10 veces mayor que el volumen de medio que contiene al embrión. La sacarosa actúa como fuerza osmótica para restringir el movimiento del agua a través de la membrana. La contracción y la expansión de los embriones observada durante el tratamiento con sacarosa son una indicación de la integridad de la membrana, y que esta no fue afectada por la congelación. Existen dos procedimientos diferentes para la retirada del glicerol, uno es introduciendo directamente los embriones directamente en una solución compuesta por PBS + 0.4% BSA y Sacarosa 1M después de 7 minutos se lavan en PBS +0.4% BSA y quedan listos para la transferencia. El otro procedimiento consiste en utilizar soluciones decrecientes del glicerol en PBS + 0.4% BSA, así pasaremos del 10% de glicerol (medio de congelación) al 6% de glicerol y sacarosa 0.3M, 3% de glicerol y sacarosa 0.3M y 0% de glicerol y sacarosa 0.3M y finalmente en el medio de transferencia; los embriones se mantienen 5 minutos en cada etapa (Valencia, 2009).

Recientemente se han desarrollado métodos prácticos y rápidos para extraer el glicerol de los embriones descongelados. Un ejemplo es el método conocido como "One step Straw" que contienen glicerol y

sacarosa separados por una burbuja de aire. Después de la descongelación la pajuela se agita, permitiendo la mezcla de soluciones y posteriormente se procede directamente a transferir el embrión. En nuestra experiencia este método es válido pero el cargado de la pajuela es muy dificultoso debido a que se debe mantener una relación 10/1 en el medio con sacarosa comparado con el medio con glicerol.

El uso del Etilenglicol 1.5M como crioprotector, proporciona una importante ventaja frente al glicerol, dado que no es necesario el uso de sacarosa para extraer al crioprotector y los embriones pueden ser transferidos directamente, ya que los embriones volverán a su estado original al contacto con el medio intrauterino (Valencia, 2009).

2.13.3. Protocolo tradicional de congelación y descongelación de embriones

- a) Seleccionar los embriones de buena y excelente calidad (calidad 1 según la IETS).
- b) Introducir los embriones en:
 - Una solución de glicerol 1.5M por 10 minutos a temperatura ambiente (20°C).
 - Soluciones de glicerol (2 pasos): 0.75M por 5-10 minutos y 1.5M por 6-10 minutos.
 - Una solución del 10% de etilenglicol a temperatura ambiente (20°C)
- c) Colocar los embriones con una solución crioprotectora en pajuelas de 0.25 ml. Utilizando la técnica descrita para transferencia (medio-aire-medio con embrión-aire-medio). Luego se sellan las pajuelas.
- d) Colocar las pajuelas en el congelador que ya está preparado a -6.5°C y se deja equilibrar por 8-10 minutos.

- e) Inducción de cristales “SEEDING”, tocando las pajuelas con un fórceps previamente enfriado en nitrógeno líquido. El “seeding” se realiza en el extremo superior de la columna de medio que contiene al embrión (lo más alejado posible del embrión).
- f) Mantener a -6.5°C por 8-10 minutos.
- g) Congelar a una velocidad de 0.3 a 0.5°C por minutos hasta llegar a -35°C .
- h) Almacenar en N_2 líquido.
- i) Descongelación: la pajuela conteniendo al embrión se debe extraer del nitrógeno líquido lo más rápidamente posible y proceder a su descongelación, con alguna de las técnicas siguientes:
 - Agua tibia (20 a 35°C).
 - Aire a temperatura ambiente (22°C).
 - Aire 10-15 segundo y agua a $25-30^{\circ}\text{C}$. Es el procedimiento más habitual y el que mejores resultados proporciona.
- j) Colocar el embrión en la solución de descongelación:
 - Soluciones decrecientes de glicerol (0.25M) por 8-10 minutos (c/u).
 - Sacarosa 0.5M - 1M por 8-10 minutos.
 - Método de 3 pasos de 5 minutos (c/u):
 - En 0.6% glicerol + 0.3M Sacarosa.
 - En 3% glicerol + 0.3M sacarosa
 - En 0.3M sacarosa.
- k) En caso de utilizar ETG como crioprotector se realiza la TE directamente en la receptora.
- l) Evaluar los embriones, colocarlos en PBS estéril, y transferirlos inmediatamente (Valencia, 2009).

2.14. SINCRONIZACIÓN DE RECEPTORAS.

Los resultados en la transferencia de embriones son parcialmente dependientes de que el estro de las receptoras no difiera en más de 24h con respecto al estadio del embrión que vamos a transferir. Las receptoras pueden ser obtenidas por un programa de detección de celos naturales o por un programa de sincronización. En el primer caso debemos contar con un gran número de receptoras, mientras que el segundo, el número se reduce sensiblemente. Esta decisión es difícil ya que en la actualidad existen más de 50 maneras diferentes de sincronizar calores.

Los índices de preñez no difieren en receptoras sincronizadas o con celo natural, no obstante, el factor más importante a tener en cuenta es una muy buena detección de celos, así como también un cuidadoso método de anotación.

La fase luteal es la parte del ciclo estral, siendo la parte más fácil de controlar por medio de agentes externos. Se han desarrollado dos técnicas básicas:

- a) Prolongar la fase progestacional, por medio de progesterona y compuestos progestágenos.- Originalmente se comprobó que las inyecciones de progesterona prolongaban el ciclo durante el tiempo en el que eran administradas. Después de concluido el tratamiento las vacas entraban en celo con una razonable sincronía. Actualmente se ha popularizado el uso de diferentes dispositivos (CRESTAR, PRID, CIDR-B ó EAZI BRED), que van a liberar el progestágeno en forma paulatina, reemplazando de esta manera a las inyecciones diarias.
- b) Inducir la luteólisis por medio de prostaglandinas.- Cuando las prostaglandinas son inyectadas en una vaca con cuerpo lúteo activo los niveles de progesterona descenderán a valores por debajo de 1 ng/ml en

24h. Normalmente los síntomas de celo se muestran a las 60 a 72 h, mientras que la ovulación ocurre a las 90-96h posteriores a la inyección de prostaglandina. El cuerpo lúteo será receptivo a la PGF_{2a} entre los días 7 y 18 del ciclo. Ninguna vaca responderá hasta el día 5 del ciclo, 25% en el día 6 y 66% en el 7. La respuesta óptima en el día 8 a 17 pero nunca supera el 96%. Por lo tanto, el 50 a 70% de un grupo de animales que se encuentra ciclando, responderá a una sola inyección. Una segunda inyección 11 días después resultará en el estro de la mayoría de los animales, ya que las vacas se encontrarán entre los días 6 y 15 del ciclo. Debido a diferencias en la respuesta es improbable que más del 90% de las receptoras se sincronicen con el donante (Mapletoft, 2005).

Existe cierta discrepancia en cuanto a los índices de preñez obtenidos cuando se compararon los tratamientos con prostaglandinas o con progestágenos sobre las receptoras. En un reporte reciente los índices de preñez en 2092 receptoras sincronizadas con SMB no fueron diferentes de 1380 que expresaron celo natural (Mapletoft, 2005).

Existen otros protocolos, que dependen de la condición de la propia explotación:

a) En ganado en sistemas intensivos. Consiste en aplicar GnRH y 7 días después PGf₂. Los calores se manifiestan generalmente entre 24 y 72 horas después de la aplicación de PGf₂ aunque la mayoría de ellos se concentran entre 24 – 36 h. estos calores son bastante fértiles el único inconveniente es la manifestación de calores en un periodo de 72 h. también solo se esperan entre el 65% al 75% de manifestación de calores. Este protocolo puede auxiliarse un poco aplicando GnRH al momento del calor de las receptoras. Es recomendable el apoyo en la detección de calores utilizando el método de crayones en la base de la cola o la aplicación de parches detectores de calores (Purley, 1995).

b) En ganado del trópico. Principalmente con cierta cruce de Cebú y q no están en la mejores condiciones corporales pero si existe una buena detección de calores, es posible sincronizar el ciclo estral aplicando en el día 0 Estradiol 17β (2.5 mg) y se coloca un dispositivo de progesterona intravaginal. También se puede poner el implante de Norgestomed (Crestar; Intervet S.A) y q trae su inyección de progesterona con estrógeno. Los implantes o dispositivos se retiran a los 7 días y se aplican 300 UI de eCG en animales jóvenes y 400 UI eCG en adultos más prontaglandina $F2\alpha$. en este momento es recomendable colocar parches o pintar la base de la cola para ayudar a detectar calores. Cualquier parche funciona bien. Se recomienda detectar calores por 3 días. Este protocolo da muy buenos resultados; sin embargo, la manifestación de calores puede ser del 75 – 85% dependiendo de la condición corporal de la receptora (Mapletoft, 2005).

En receptoras que se encuentran en buenas condiciones corporales y reproductivas y la detección de calores fuera poco satisfactoria .El día 0 se inicia igual que el protocolo anterior con una inyección de estradiol 17β (2.5 mg) y se pone un dispositivo intravaginal o un implante en la oreja 7 días después se retiran los implantes y se aplican 300 UI de eCG con animales jóvenes y 400 UI eCG en adultos más $PGf2\alpha$. A las 24 horas de retirados los implantes se pone 2.5 mg de estradiol 17β . Al igual que los otros protocolos es de utilidad colocar parches o pintar la base de la cola para ayudar a detectar calores. Se recomienda detectar calores por 3 días. La manifestación de calores en este protocolo es sumamente eficiente ya que cerca del 100% de las receptoras entran en calor 24 horas posteriores a la aplicación de estradiol 17β (Mapletoft, 2005).

La desventaja de este protocolo es q se pueden detectar calores falsos y las receptoras no formaran CLs. Otra desventaja es que las receptoras pueden manifestar calores nuevamente 48 a 72 horas después del calor inicial y no se sabe cuál calor fue el verdadero. De tal manera que si una

receptora efectivamente repitió calor sería un receptora día 5 o incluso 4 el día de la transferencia de embriones lo q perjudicaría la fertilidad enormemente y peor aún, si los embriones transferidos fueran embriones congelados. Para incluir la manifestación de calores 2 – 3 días después del calor inducido se recomienda la aplicación de GnRH al momento del calor de las receptoras. La fertilidad de este protocolo puede ser bastante buena siempre y cuando las receptoras estén en muy buenas condiciones corporales y reproductivas (Mapletoft, 2005).

2.14.1. Resincronización de las Receptoras.

Este método es muy práctico y permite la utilización de las receptoras vacías 2 veces en 30 días. Este método consiste en poner los CIDR usados a las receptoras transferidas y no transferidas 7 días después de la transferencia de embriones (Bo et al., 2005). El CIDR se retira 7 días después o sea el día 21 – 22 del ciclo estral de las receptoras. Este método no utiliza ninguna hormona solo se pone y quita el CIDR 7 días después. La mayoría de las receptoras vacías entran en calor entre 24 y 48 horas después de retirado el implante (Bo, 2005).

El día 30 del ciclo estral de las receptoras se procede a transferir las receptoras q repitieron celos. Generalmente se transfieren embriones congelados. Con el auxilio del ultrasonido se puede aprovechar para diagnosticar las gestaciones del resto de las receptoras y se sabrá el resultado de la transferencia de embriones aproximadamente 3 semanas después de haber transferido los embriones. Este método es sumamente práctico y permite la reutilización tanto de los CIDRs como de las receptoras en 30 días (Lammoglia, 2010).

2.14.2. Manejo de receptoras.

Dos de los factores de manejo que determinan el éxito o fracaso de un programa de sincronización son la nutrición y el intervalo post parto. Cuando las receptoras fueron clasificadas de acuerdo a su estado nutricional en el momento de la transferencia en una escala que va de 1 (flaca) a 5 (gorda). Los índices de preñez fueron superiores en las receptoras clasificadas como 3 y 4. Se basa específicamente en la palpación de las apófisis transversas de las vértebras lumbares y la prominencia de la columna vertebral. Otros factores nutricionales en los que se debe tener especial cuidado son las deficiencias minerales como fósforo y cobre. Si se utilizaran vacas con cría, estas deben tener al menos un intervalo post-parto de más de 60 días y un tracto reproductivo normal a la palpación o exanimación ultrasonografica. Además deben estar en un periodo de aumento de peso de peso y si es posible, haber ciclado 3 veces antes de entrar al programa de sincronización. Si vamos a utilizar novillas estas deben tener un peso de más de 300 kg, tener un estado óptimo (condición corporal: 3.0 – 3.5) y ciclar normalmente (cada 18 a 21 días). En cualquier caso, el peso y la edad debe estar acorde a lo estándar en la raza (Avila, 2009).

No se deben descuidar los aspectos sanitarios del rebaño así como la disponibilidad del personal e instalaciones adecuadas. En lo posible el personal afectado en la detección de celos debe llevar y recopilar datos precisos y detallados. Las instalaciones deben ser funcionales y seguras tanto para el operador como para los animales, especialmente si las receptoras son de producción de carne de razas autóctonas. Además. Es importante contar con un techo sobre la manga y en lo posible con una pequeña habitación que pueda permitir la instalación de microscopios y demás materiales en una corta distancia de la manga (Avila, 2009).

Todos estos factores deben ser tenidos en especial consideración para el éxito del programa. Es fundamental tener una debida comunicación con el personal. Es inclusive recomendable reunir a todas las personas afectadas al programa antes de comenzar con la sincronización (Avila, 2009).

2.15. TECNICAS DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES BOVINOS.

Existen 2 técnicas para la implantación de los embriones en las hembras receptoras; según sean cruentas (quirúrgicas) o no cruentas (no-quirúrgicas). La técnica de elección es la forma no quirúrgica, sin embargo existe una gran diferencia en los resultados entre ellas, aunque estas diferencias se deben no tanto a la técnica en sí, sino a la experiencia y habilidad de cada persona.

Las técnicas quirúrgicas tienden a producir mejores resultados (mayor porcentaje de preñez), pero tienen el inconveniente de que se necesita más personal entrenado y ciertas facilidades para realizarlas en la granja (Avila, 2009).

2.15.1. TRANSFERENCIA QUIRÚRGICA.

Puede ser realizada mediante laparotomía ventral o lateral:

a) Laparotomía Ventral

Esta técnica no se puede realizar en la práctica en la granja. Se ha de realizar en quirófano con anestesia general. Tiene aplicación en investigación (fertilización in vitro, clonación, etc.) (Avila, 2009).

b) Laparotomía Lateral

Esta técnica no es difícil de realizar y no requiere demasiado equipo de cirugía. Es necesario tener un potrero protegido de la lluvia y buenas

instalaciones para mantener un grupo de animales. Un veterinario con ayudante y otras 2 personas más pueden transferir 6 a 8 embriones por hora (en estudios canadienses se obtuvo un porcentaje de preñez del 65% utilizando esta técnica, en 1980) (Avila, 2009).

La receptora es colocada en un potro que permite realizar la laparotomía lateral izquierda o derecha. Primero se procede a realizar un examen rectal para constatar la presencia del cuerpo lúteo. Los preparativos de asepsia de la operación son corte de pelo en el área, lavado y desinfección. Se procede a inyectar anestesia local (xilocaína al 2%) por infiltración, también se puede usar anestesia paravertebral (L: 1, 2, 3). Se realiza la incisión paralela a la última costilla en el lado ipsilateral del ovario que posee el CL, de no más de 10 cm de longitud y lo más posterior que sea posible (aproximadamente a una mano de distancia de las apófisis de las vértebras lumbares y a una mano del borde de la última costilla). Se incide la piel y las capas de tejido. El músculo oblicuo abdominal interno y el recto son separados con los dedos o con una pinza roma (Avila, 2009).

Se procede a identificar nuevamente el cuerpo lúteo (palpando los ovarios directamente en la cavidad abdominal). Muchas veces es posible identificar visualmente el ovario a través de la incisión. Se exterioriza el cuerno de ese lado traccionando el ligamento ancho a la altura del tercio distal del cuerno. Para una mejor sujeción del cuerno se usan compresas de gasa entre los dedos pulgar e índice. El cuerno es punzado cerca de la unión útero-tubárica con una aguja roma o estilete (sonda de pezón) hasta alcanzar el lumen. El estilete es retirado, y el embrión es depositado en el lumen uterino utilizando un catéter intravenoso, presionando cuidadosamente el émbolo de la jeringa. El catéter es retirado lentamente y el útero es devuelto a la cavidad abdominal. La herida operatoria puede ser suturada por capas (peritoneo, músculo, piel) o simplemente se sutura la piel (sutura simple) dejando las otras capas sin suturar. Esta última

forma es muy rápida y no tiene mayores complicaciones para el animal (Avila, 2009).

2.15.2. MÉTODO NO QUIRURGICO.

El método no quirúrgico de transferencia de embriones es usado con mucho éxito por la mayoría de veterinarios. Casi todos utilizan pajuelas francesas de 0,25 ml, una vaina desechable plástica, y un inyector de Cassou para IA. También hay algunas modificaciones como por ejemplo pipetas metálicas, inyectores específicos para TE de metal o de plástico de un solo uso, para evitar infecciones, etc. La receptora es colocada en un potro o sujeción y se procede a la palpación rectal para localizar el ovario que contiene el cuerpo lúteo. Esta oportunidad se aprovecha, en muchas ocasiones, para sacar las heces del recto lo que facilitará la manipulación del aparato reproductor y posteriormente la colocación del embrión. El embrión se coloca una anestesia epidural baja (xilocaína al 2%). La región perineal y vulva se lavan con jabón desinfectante, agua y se secan (Avila, 2009).

El embrión se ubica dentro de una pajuela esterilizada (0,25ml) de la siguiente forma:

- a) Aspiración de un pequeño volumen de medio de cultivo.
- b) Burbuja de aire.
- c) Aspiración de un pequeño volumen de medio de cultivo.
- d) Burbuja de aire.
- e) Aspiración de un pequeño volumen de medio de cultivo con el embrión.
- f) Burbuja de aire.
- g) Aspiración de un pequeño volumen de medio de cultivo.

La primera columna de medio se hace tocar con el algodón y el alcohol polivinilo del extremo cerrado de la pajuela, esto cella un lado y no permite la salida del embrión antes de ser transferido. La pajuela con el embrión se coloca dentro del catéter de TE y este dentro de una vaina protectora o camisa sanitaria (Avila, 2009).



Figura 3. Esquema de llenado de la pajilla (Ávila, 2009).

Antes de introducir el catéter en la vagina se le coloca lubricante estéril que permitirá pasarla más fácilmente a través del cérvix. Con la mano izquierda, el operador sujeta el cérvix a través de la pared del recto. El catéter se introduce en el canal cervical y, posteriormente se introduce, con ayuda de la mano, en el cuerno ipsilateral al Cuerpo Lúteo. El embrión se deposita aproximadamente a la mitad del cuerno. El catéter es removido suavemente y se retira la mano del recto. Todo ese procedimiento debe realizarse lo más rápido posible. Si hay mucha demora en la operación la posibilidad de preñez será menor, lo que podría deberse a daño de la mucosa del útero por exceso de manipulación. La excesiva manipulación del cérvix no parece ser tan negativa como la excesiva manipulación de los cuernos uterinos (Avila, 2009).



Para obtener un buen porcentaje de preñez, a parte de la destreza y experiencia en las técnicas descritas, es necesario que las receptoras sean animales sanos, que sus ciclos reproductivos hayan sido normales y que estén en buen estado de nutrición. En la medida en que las receptoras estén en buenas condiciones, la eficiencia de la transferencia de embriones, traducida en preñeces será mayor.

Desde un punto de vista práctico la transferencia de embriones es fácil y apasionante. Pero cada paso debe ser cuidadosamente realizado para que la técnica tenga éxito. El porcentaje de preñez obtenido por el método no quirúrgico varía del 35 al 65% dependiendo de la calidad de los embriones transferidos y de la habilidad del operador para realizar todos los pasos de la técnica. Generalmente el porcentaje de preñez es de alrededor del 60% con embriones frescos y 40 a 50% con embriones congelados. Se puede anticipar una pérdida del 10% desde la detección de preñez y el destete de la cría (Avila, 2009).

Normalmente se dice que una vaca promedio produce por tratamiento superovulatorio 10 a 12 ovulaciones con 8 a 10 embriones recuperados, de los cuales 5 a 6 son transferibles terminando finalmente con 3 ó 4 preñeces (Avila, 2009).

III MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES.

3.1.1. Materiales de campo.

3.1.1.1. Biológicos.

- a) 20 vacas Holstein Friesian.
- b) Hormonas a usarse:
 - Folltropin (FSH-p 400mg diluidos en 20ml de solución fisiológica, la relación FSH-LH es de 84/16).
 - Folligon (eCG 5000UI con diluyente).
 - Gestavec (P4 en suspensión en una concentración de 50mg).
 - CIDR (P4 en un implante de silicón impregnado por 1.38 gr de progesterona).
 - Grafoleon (BE inyectable intramuscular).

3.1.1.2. Físicos.

- a) Equipos de sujeción.
- b) Materiales generales de asepsia.
- c) Registros de observación.
- d) Ecografo Mindray DP 6600
- e) Transductor Multifrecuencia 5 a 10MHZ
- f) Estereomicrocopio
- g) Placa térmica
- h) Congeladora de embriones
- i) Computador portátil
- j) Pistola de transferencia de embriones
- k) Pajillas
- l) Sonda Foley

- m) Sonda de doble vía en Y
- n) Filtro para embriones bovinos
- o) Dilatador cervical
- p) Mandril o estilete
- q) Micropipetas
- r) Puntas de pipetas
- s) Placa Petri
- t) Placas esfera de reloj
- u) Jeringuillas descartables
- v) Agujas descartables

3.1.1.3. Químicos.

- a) Medio de lavado PBS
- b) Medio Holding (medio de mantenimiento).
- c) Medio de congelación Etilenglicol.
- d) Nitrógeno Líquido.

3.1.1.4. Instalaciones. El trabajo de campo y de Laboratorio, fue desarrollado en su totalidad en las instalaciones de la Hacienda Chunllin La Carnela del Cantón Chambo.

3.2. MÉTODOS:

3.2.1. Localización y duración de la investigación.

La presente investigación se llevó a cabo en la Hacienda Chunllin La Carnela, ubicada en la Sierra Ecuatoriana, en el sector Chambo Alto, Cantón Chambo, Provincia de Chimborazo, la misma que duró 150 días, distribuidos en el trabajo de campo y laboratorio.

Cuadro 11. Datos meteorológicos del cantón Chambo. (Colegio Nacional Chambo, 2009).

PARÁMETRO	VALOR
Altitud m.s.n.m	2800
Temperatura °C	15°C
Precipitación mm/año	800 mm
Humedad Relativa %	67%

3.2.2. Criterios de inclusión:

Se utilizaron 20 vacas, escogidas bajo los siguientes criterios de inclusión:

- a) Ganado Holstein Friesian.
- b) Edad rango de 5-7 años, con un promedio de 3 a 5 partos
- c) Producción promedio de 20 litros/vaca/día, estas vacas fueron promediados en los últimos 15 días.
- d) Rango de días en lactancia ≥ 80 días y ≤ 120 días.
- e) Condición corporal ≥ 2.75 y ≤ 3.75 en la escala de 1 a 5.

3.2.3. Criterios de exclusión:

- a) No haber presentado ningún trastorno (distocia o metabólico) al momento del parto.
- b) No se incluyeron animales de primer parto.

3.2.4. Características de las vacas para la investigación.

a) Monitoreo de las vacas:

Previo al inicio de la investigación se procedió a monitorear ecográficamente a todas las vacas, a fin de evaluar los ovarios, para constatar de que no exista ninguna patología (quistes ováricos, ovarios atrésicos, cuerpos lúteos cavitarios); de la misma manera se evaluaron los cuernos uterinos para descartar patologías como metritis, piómetra), el cérvix para descartar traumatismo producidos en el parto y vagina para eliminar patologías como urovagina, neumovagina entre otras.

3.2.5. Manejo de la dieta de los animales.

El manejo y alimentación fue similar para todos los animales, el cual consiste en pastoreo en potreros de Raygrass (*Lolium perenne*); alimento balanceado de acuerdo a la producción de leche a razón de 2,2 libras/litro producido, y 250 g de grasa baypass; ordeño mecánico dos veces al día (4 am y 4 pm).

3.2.6. Tratamientos en estudio.

Las vacas fueron divididas completamente al azar en dos grupos de 10 animales cada uno; siendo cada grupo un tratamiento y cada vaca una unidad experimental. Para la selección de los animales para cada uno de los tratamientos, se utilizó una ánfora en donde se depositaron los números de los animales, extrayendo cada uno de los números para la agrupación de acuerdo a los tratamientos que se describen en el siguiente cuadro.

Cuadro 12. Distribución de los tratamientos de estudio.

TRATAMIENTOS	N	DIAS 0	4	5	6	7	8	9	15
FOLLTROPIN (FSH-p liofilizado porcino) + eCG (Gonadotropina coriónica equina) 400 UI	10	Implante de P4 (CIDR) + 100mg P4 + 3mg BE.	FSH -p 6ml	FSH -p 5ml	FSH-p 4ml + PG2a 4 ml	FSH-p 3ml + 400UI eCG + Retirar implante CIDR	250 ug de Gona dorelina + 2 IA	IA	Colecta de embriones + 2 ml PG2a
CONTROL Ó TESTIGO (sin eCG)	10	Implante de P4 CIDR + 50mg P4 + 3mg BE	FSH - p 6ml	FSH - p 5ml	FSH - p 4ml + PG2a 4ml	FSH-p 3ml + Retirar implante CIDR	250 ug de Gona dorelina + 2 IA	IA	Colecta de embriones + 2 ml PG2a

BE= Benzoato de Estradiol

FSH-p= Folltropin

CIDR= Implante de progesterona.

P4= Progesterona



I.A.T.F.= Inseminación Artificial a Tiempo Fijo.

eCG = Gonadotropina coriónica equina

PG2a= Prostaglandina

3.2.7. Procedimiento Experimental:

3.2.7.1. Selección de las vacas donadoras. Para la selección de la vacas donadoras analizamos fundamentalmente al gran potencial genético que puede ser transmitido a su descendencia y además sus registros de producción lechera que deben ser altos; como también se revisó su historia reproductiva, estado general de salud, nutrición, etc. Una vez seleccionada la donadora se realizó el chequeo ginecológico por vía rectal, el mismo que nos dio resultados acerca del tono uterino, tamaño de los ovarios, simetría en los cuernos, el grosor de las paredes del útero y de esta manera nos percatamos del estado en el que se encuentra el aparato reproductivo para iniciar el programa de superovulación.

3.2.7.2. Selección de las vacas receptoras. Para la selección de las receptoras no fue necesario tomar en cuenta la genética del animal, más bien, los parámetros que se consideraron fueron fundamentalmente el tamaño y la edad de los animales, así como también poseer un aparato reproductivo anatómica y fisiológicamente en perfecto estado. Una vez que se efectuó la preselección del grupo de receptoras, procedimos a verificar la etapa del ciclo reproductivo en el que se encontraban por medio del chequeo ginecológico, en donde seleccionamos únicamente a animales que tenían un cuerpo lúteo funcional y que su aparato reproductivo esté en perfecto estado; descartando animales recién ovulados, con quistes ováricos o quistes luteales, dejando pendiente los animales que se encontraron por ovular; para presentarse el celo los mismos días que las receptoras.

3.2.7.3. Superovulación de las vacas donantes.

Una vez seleccionados los animales y divididos en dos grupos:

- a) Grupo 1.- Vacas con tratamiento n=10 (eCG más Folltropin-V).
- b) Grupo 2.- Vacas sin tratamiento n=10 (sin eCG más Folltropin-V).

Al Grupo 1 se procedió a la aplicación de los tratamientos, el día 0, se insertó el dispositivo implante intravaginal de Progesterona CIDR (1.38gr); más 3 mg de Benzoato de Estradiol (Grafoleon) y P4 100mg (Gestavec) por vía IM (Intramuscular). El día 4, se aplicó el tratamiento de superovulación que consistió en aplicar Folltropin –V (FSH-p) IM cada 12 horas en dosis decrecientes durante cuatro días seguidos; el día 6, se aplicó dos veces PG2a 2ml (estrumate) IM en la mañana y en la tarde; el día 7, aparte de inyectar las últimas dosis de FSH-p, se retiró el implante CIDR y se aplicó dos dosis de 200 UI de eCG en la mañana y tarde ; El día 8, se inyectó IM 2,5 ml Fertagyl (250 ug de Buseralina) y se inseminó 2 veces en la mañana y tarde; el día 9, se inseminó una dosis, y el día 15, se colectó los embriones para su posterior evaluación y clasificación.

Cuadro 13. Cronograma de Superovulación con eCG.

Día 0	CIDR (Dispositivo liberador P4) + 100mg de P4 + BE 3mg
Día 4	FSH-p (mañana) 3ml - FSH-p (tarde) 3ml dosis decreciente
Día 5	FSH-p (mañana) 2,5 ml - FSH-p (tarde) 2,5 ml
Día 6	FSH-p 2 ml + PGF2a 2ml (500 ug de D-cloprostenol). (mañana) - FSH-p 2ml + PGF2a 2ml (500 ug de D-cloprostenol) (tarde)
Día 7	FSH-p 1,5 ml + eCG 200 UI (mañana) - FSH-p 1,5 ml + eCG 200 UI (tarde) retirar dispositivo intravaginal P4 (CIDR)
Día 8 Estro	IA (mañana) - IA (tarde) + 250 ug gonadorelina (Fertagyl)
Día 9	IA (mañana)
Día 15	Colecta de embriones + PGF2a 2ml

Con los animales control se procedió de la misma manera, excluyendo la aplicación de eCG. Siete días post inseminación se recolectó los embriones para evaluar y clasificarlos; para la recolección de los embriones se realizó la técnica no quirúrgica, de circuito cerrado.

Para la colecta de embriones se empleó el medio PBS, el mismo que se calentó a baño maría hasta que alcance una temperatura de 37°C, se tomó un volumen promedio por cuerno de 500 ml. Una vez colectado los embriones se buscaron con la ayuda de un estéreo microscopio; luego de la búsqueda se utilizó el medio Holding para lavar los embriones y proceder a la valoración y clasificación de los mismos de acuerdo al IETS.



3.2.7.4. Sincronización de animales receptoras.

Para la sincronización de receptoras se empleó 2ml de PGF2a (Estrumate) colocado por vía intramuscular evidenciando cuerpo lúteo funcional, con el objetivo de que se presente celo igual a la donadora o a su vez se diferencie más o menos 1 día. Los celos de las receptoras se controlaran a las 48 – 72 – 96 horas posteriores a la administración de PGF2a.

3.2.7.5. Preparación de equipos y materiales.

La preparación del material se realizó con 12 horas de anticipación, donde se constató la presencia de todos aquellos materiales que fueran útiles al momento de realizar la recolección. Es necesario aclarar que ahora no se utilizaron soluciones preparadas (PBS modificado) para lavado uterino como años atrás, sino más bien esta vienen listas para utilizarlas, y para la congelación de embriones (etilenglicol), la marca que utilizaremos es AGTECH.

3.2.7.6. Lavado uterino y recolección de embriones.

En primer lugar se ejecutó un previo chequeo ginecológico con ayuda de palpación rectal y con el ecógrafo se verificó la presencia de cuerpos lúteos en los ovarios y de esta manera se tuvo la idea de cuantos embriones aproximadamente esperamos recuperar, ya que de antemano conocemos que por cada ovulación se forma un cuerpo lúteo; además, con la palpación rectal se estimuló la evacuación de heces al animal; luego se limpió el tren posterior del animal con abundante agua y jabón; lo secamos y colocamos dependiendo del tamaño del animal entre 5 y 8 ml de anestesia sin epinefrina (Lidocaína), por vía epidural, con ello se evitó que el animal entre en estrés por el manipuleo que se realizó en el útero;

como el tren posterior del animal está insensible, se ató su cola de una manera que no estorbe en las labores de limpieza.

Antes del lavado se colocó el litro de Flusing (PBS modificado) a unos 50cm más alto que la vaca y se verificó el funcionamiento de las sondas, el filtro y el matraz. El lavado inició con la introducción por la vulva del catéter Folley de dos vías, conjuntamente con un estilete para facilitar su paso por el cérvix, este catéter se ubicó en el tercio medio del cuerno uterino y se infló el balón unos 5 cm, pasado la bifurcación del útero la cantidad de aire fue de 9 a 15 ml dependiendo del tamaño de los cuernos; lo importante fue cerrar el paso para que no se escape el medio de lavado. La cantidad de líquido que ingresará debe ser igual a la cantidad de líquido que recogemos, por lo general se opta a ocupar 500 ml en cada uno de los cuernos en cantidades que van de 30 – 60 ml dependiendo del tamaño del mismo hasta completar la cantidad señalada, al líquido se recogió en un matraz previo paso por el Filtro Ecom que es el lugar donde se quedan los embriones. Una vez que se acabó la recolección en un cuerno se realizó la misma operación para el segundo cuerno, los lavados en promedio duraron entre 10 a 30 minutos dependiendo del tamaño del útero y la presencia de mucosa en el mismo.

3.2.7.7. Visualización de los embriones.

Para la realización de la visualización se difundió el líquido que contenía los embriones del filtro Ecom a una placa Petri dish integrity cuadrículada y se dejó en reposo por unos 15 minutos, logrando así que los embriones se depositen al fondo de la placa para ser visualizados con la ayuda del estéreo microscopio. Una vez ubicado los embriones con la ayuda de una micropipeta, se pasó a una placa Petri dish multi web bowl, en donde permanecieron hasta su clasificación.

La etapa de visualización fue muy minuciosa, ya que se observó repetidas veces removiendo el líquido para que algún embrión adherido a la mucosa se separe y sea ubicado; posteriormente se eliminó el líquido sobrenadante seguros que no quede ningún embrión.

3.2.7.8. Calificación de los embriones.

La calificación se realizó con ayuda del estereomicroscopio, para ello los embriones se ubicaron en la placa Petri dish multi web bowl, y nos fijamos en su apariencia general, número, compactación y tamaño celular; color y textura del citoplasma, presencia de vacuolas, blastómeros extruidos de la masa embrionaria, estadio del desarrollo en base a la edad, regularidad de la zona pelúcida y presencia de desechos celulares. En base a estas características morfológicas cada embrión recibió una clasificación por su calidad:

- Excelente
- Bueno
- Regular
- Malo
- Muertos o degenerados.

3.3. FORMULACIÓN DE HIPÓTESIS O TENTATIVAS.

El uso de eCG en los últimos días de la superovulación con Foltropin-V (FSH-p) mejora 20% el número total embriones colectados, ovocitos fertilizados y número de embriones fértiles.

3.4. VARIABLES E INDICADORES:

3.4.1. Variable Dependiente:

- Gonadotropina Coriónica Equina (eCG)

3.4.2. Variable Independiente:

- Número de cuerpos Lúteos.
- Número de Folículos.
- Número de estructuras colectadas según la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones.
- Número de Embriones Transferibles y no Transferibles

Cuadro 14. Operacionalidad de las Variables.

VARIABLE	CUANTITATIVA	INDICADOR	CUALITATIVA
Gonadotropina Corionica equine (eCG)	Número de Cuerpos Lúteos.	Detección ultrasonografía	Cuerpos Lúteos.
	Número de Folículos	Detección ultrasonografía	Folículos anovulatorios
	Número de estructuras colectadas segun la IETS	Detección Estereomicroscopio	Clasificación de las estructuras según la IETS: Ufos, Mórula, Mórula Compacta, Blastocisto temprano, Blastocisto, Blastocisto Expandido, Blastocisto Protruido, Blastocisto eclosionado.
	Número de Embriones Transferibles y no Transferibles	Detección Estereomicroscopio	Total de Embriones Transferibles y Total de Embriones no transferibles.

IETS: Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones

3.5. DISEÑO EXPERIMENTAL

Este trabajo se enmarca dentro de un tipo de estudio experimental, de corte transversal, porque busca especificar las circunstancias más importantes de un fenómeno sometido a un análisis y estudio como es: El efecto de la aplicación de gonadotrofina coriónica equina (eCG) en vacas donantes de embriones superovuladas con Foltropin-V (FSH-p)

Tomando en consideración, raza, edad de las superovuladas, condiciones de manejo para que exista uniformidad y no se alteren los resultados, tamaño de la muestra, se aplicó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con dos tratamientos, 10 repeticiones por tratamiento; para el análisis de la variable del número de cuerpos Lúteos, folículos anovulatorios y número de estructuras colectadas según la IETS, embriones transferibles y embriones no transferibles se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) y prueba de Chi-Cuadrado utilizando los programas Minitab 16 y SPSS versión 19, con un nivel de significancia exigido de $p \leq 0.05$.

IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. RESULTADOS.

4.1.1. Resumen estadístico de las variables representativas.

Al realizar las tabulaciones de los datos registrados en cuanto a la presencia de cuerpos lúteos (CL) por ovario, así como la presencia de folículos anovulatorios y el total de estructuras obtenidas por tratamientos, se obtuvo los siguientes resultados

Cuadro 15. Estadística descriptiva de las variables.

Variable	eCG + Folltropin			Folltropin		
	Media	Desv. típ.	Total	Media	Desv. típ.	Total
# CL Ovario derecho	3,5	2,17	35	4,6	1,43	46
# CL Ovario izquierdo	3,1	1,19	31	3,6	2,67	36
Cuerpo lúteos totales	6,2	2,80	66	8,2	3,16	82
Folículo Anovulatorio Ov. Derecho	0,3	0,67	3	1,2	0,91	12
Folículo Anovulatorio Ov. Izquierdo	0,7	1,06	7	1,4	1,35	14
Folículos anovulatorios totales	1	1,33	10	1,8	1,79	26
Total de Estructuras	2,2	2,3	22	3,1	1,96	31

4.1.2. Resumen estadístico del total de las estructuras encontradas luego del lavado de las vacas.

Luego del lavado de las vacas se realizó la tipificación de las estructuras obtenidas encontrándose los siguientes resultados:

Cuadro 16. Estadística descriptiva del total de las estructuras encontradas en la investigación por tratamiento.

Estructuras	eCG + Folltropin			Folltropin			Total de estructuras
	Media	Desv. típ.	Total	Media	Desv. típ.	Total	
Ovocitos no fertilizados	0,1	0,32	1	0,2	0,42	2	3
Morulas	1,8	1,87	18	2	1,15	20	38
Blastocistos	0,3	0,48	3	0,9	0,73	9	12
Total	22			31			53

4.1.3. Resumen estadístico del total de embriones transferibles y no transferibles.

Al clasificar las estructuras embrionarias viables (se descartó ovocitos infertilizados) se determinaron como transferibles y no transferibles, así:

Cuadro 17. Embriones transferibles y no transferibles generados en la investigación.

Embriones	eCG + Folltropin			Folltropin			Total de estructuras
	Media	Desv. típ.	Total	Media	Desv. típ.	Total	
Transferibles	1,9	1,97	19	2,7	1,78	27	46
No transferibles	0,3	0,68	3	0,4	0,52	4	7
Total	22			31			53

4.1.4. Análisis estadístico de las variables estudiadas.

4.1.4.1. Prueba de Chi- cuadrado del número de cuerpos lúteos.

Cuadro 18. Chi cuadrado del número de cuerpos lúteos encontrados en la investigación.

Tratamientos	Ovario derecho	Ovario Izquierdo	Total	Chi-cuad.	P
eCG + Folltropin	35	31	66	0,139	0,709
Folltropin	46	36	82		
Total	81	67	148		

De acuerdo a la prueba de Chi cuadrado (0,139; $p > 0,05$) se establece que existió homogeneidad (no significativo) en la presencia de cuerpos lúteos en entre los tratamientos empleados tanto en el ovario derecho como en el izquierdo.

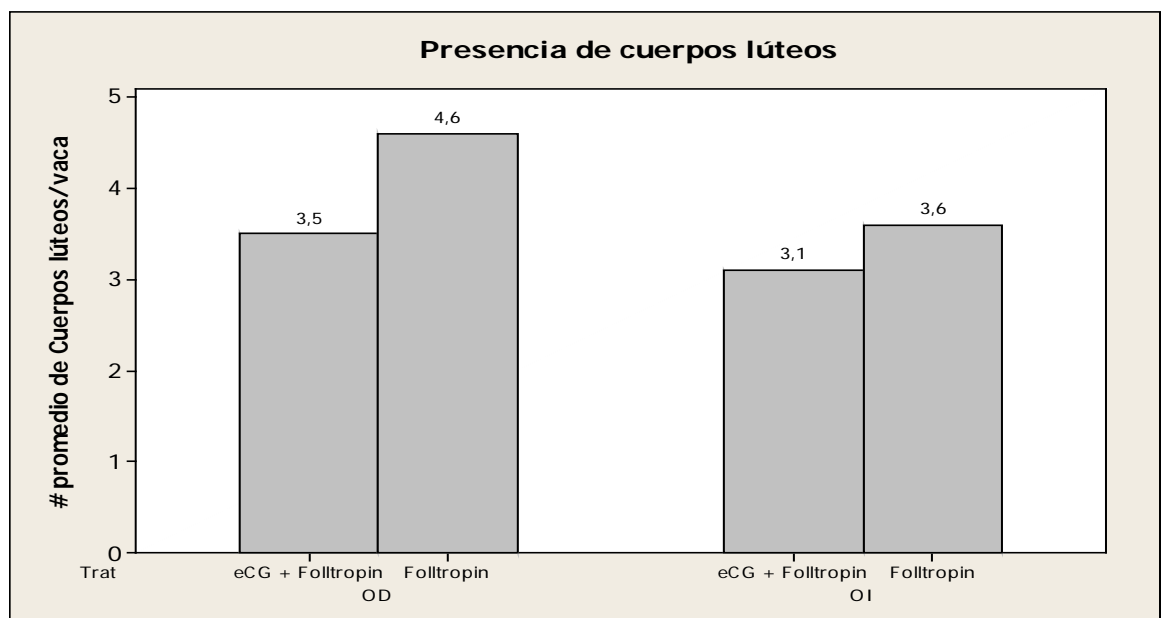


Grafico 1. Representación en barras de la presencia de cuerpos lúteos en los ovarios.

4.1.4.2. Prueba de Chi- cuadrado del número de folículos anovulatorios.

Cuadro 19. Chi cuadrado del número de folículos anovulatorios encontrados en la investigación.

Tratamientos	Ovario derecho	Ovario izquierdo	Total	Chi-cuad	P
eCG + Folltropin	3	7	10	0,78	0,38
Folltropin	12	14	26		
Total	15	21	36		

De acuerdo a la prueba de Chi cuadrado (0,78; $p > 0,05$) se establece que existió homogeneidad (no significativo) en la presencia de Folículos anovulatorios en entre los tratamientos empleados tanto en el ovario derecho como en el izquierdo.

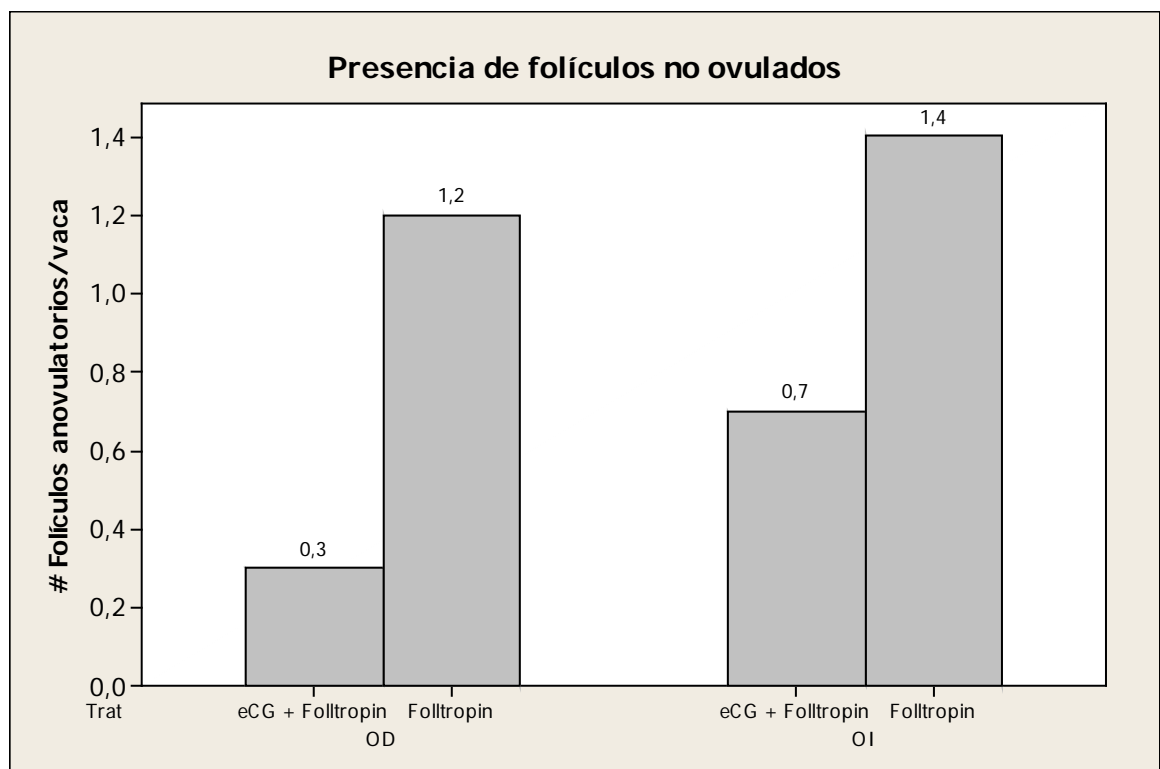


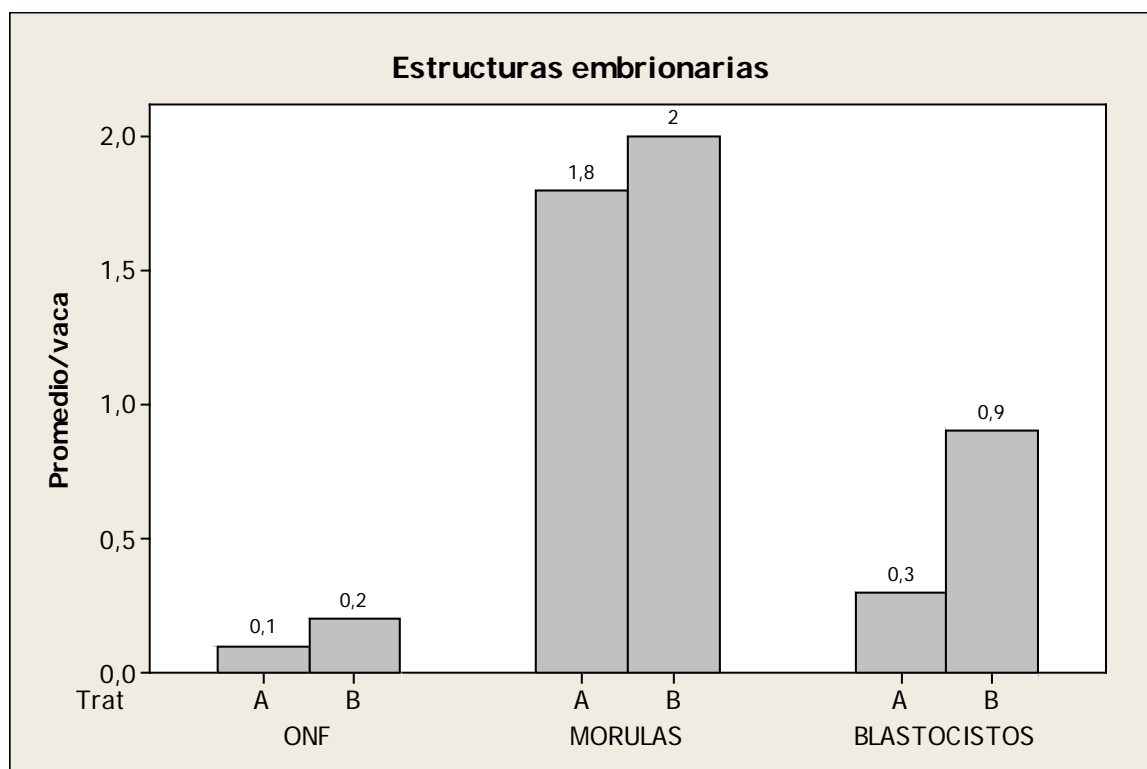
Gráfico 2. Representación en barras de los folículos anovulatorios obtenidos en la investigación.

4.1.4.3. Prueba de Chi- cuadrado del total de estructuras embrionarias encontradas.

Cuadro 20. Chi cuadrado del total de estructuras embrionarias encontradas.

Tratamientos	Ovocitos Infertilizados	Mórula	Blastocisto	Total	Chi-cuad	P
eCG + Folltropin	1	18	3	22	1,97	0,34
Folltropin	2	20	9	31		
Total	3	38	12	53		

De acuerdo a la prueba de Chi cuadrado (1,97; $p > 0,05$) se establece que existió homogeneidad (no significativo) en la presencia de diferentes estructuras embrionarias entre los tratamientos empleados en lo que respecta a ovocitos infertilizados, mórulas y blastocistos.



Tratamiento A.- eCG + Folltropin; Tratamiento B.- Folltropin; ONF.- Ovocitos no fecundados

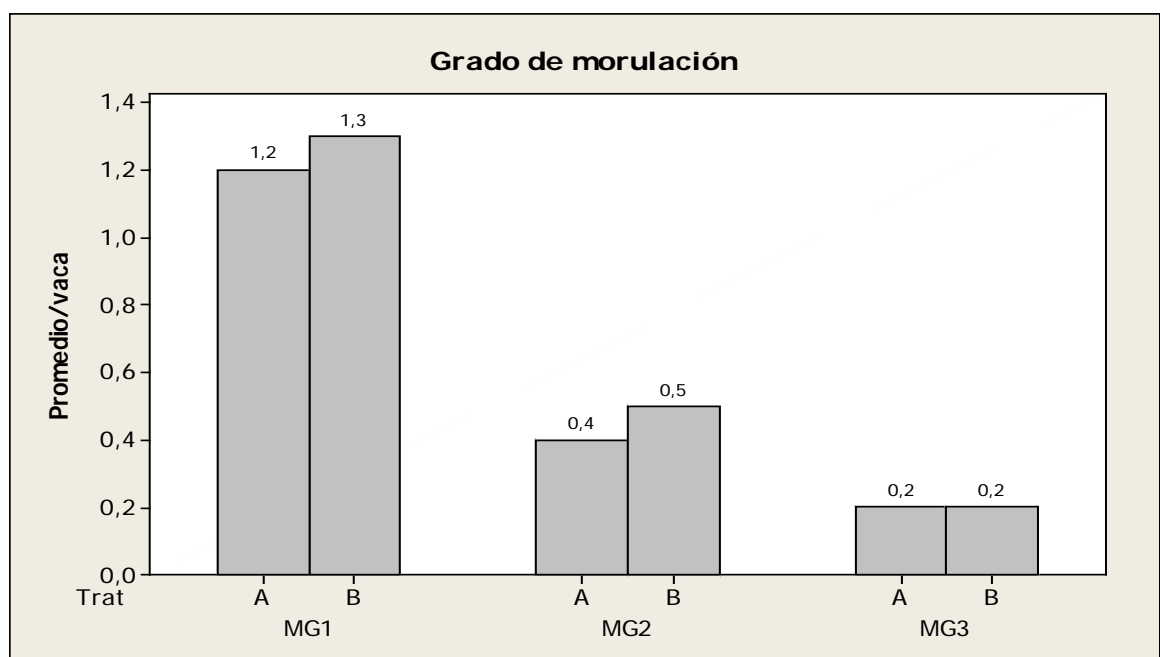
Gráfico 3. Representación en barras de las estructuras embrionarias encontradas en los dos tratamientos.

4.1.4.4. Prueba de Chi- cuadrado del grado de morulación.

Cuadro 21. Chi cuadrado del grado de morulación encontrados en la investigación.

Tratamientos	Grado 1	Grado 2	Grado 3	Total	Chi-cuad	P
eCG + Folltropin	12	4	2	18	0,05	0,97
Folltropin	13	5	2	20		
Total	25	9	4	38		

De acuerdo a la prueba de Chi cuadrado (0,05; $p > 0,05$) se establece que existió homogeneidad (no significativo) en el grado de morulación entre los tratamientos empleados.



Tratamiento A.- eCG + Folltropin; Tratamiento B.- Folltropin; MG 1, 2, 3.- Grado de morulación.

Gráfico 4. Representación en barras del grado de morulación.

4.1.4.5. Prueba de Chi- cuadrado del grado de Blastocistos.

Cuadro 22. Chi cuadrado del grado de Blastocistos encontrados en la investigación.

Tratamientos	Grado 1	Grado 2	Total	Chi-cuad	P
eCG + Folltropin	3	0	3	1,33	0,24
Folltropin	6	3	9		
Total	9	3	12		

De acuerdo a la prueba de Chi cuadrado (1,33; $p > 0,05$) se establece que existió homogeneidad (no significativo) en el grado de blastocisto entre los tratamientos empleados hay que tener presente que mientras menor sean las frecuencias observadas el valor de significación va a aumentar influenciando en la interpretación de los resultados.

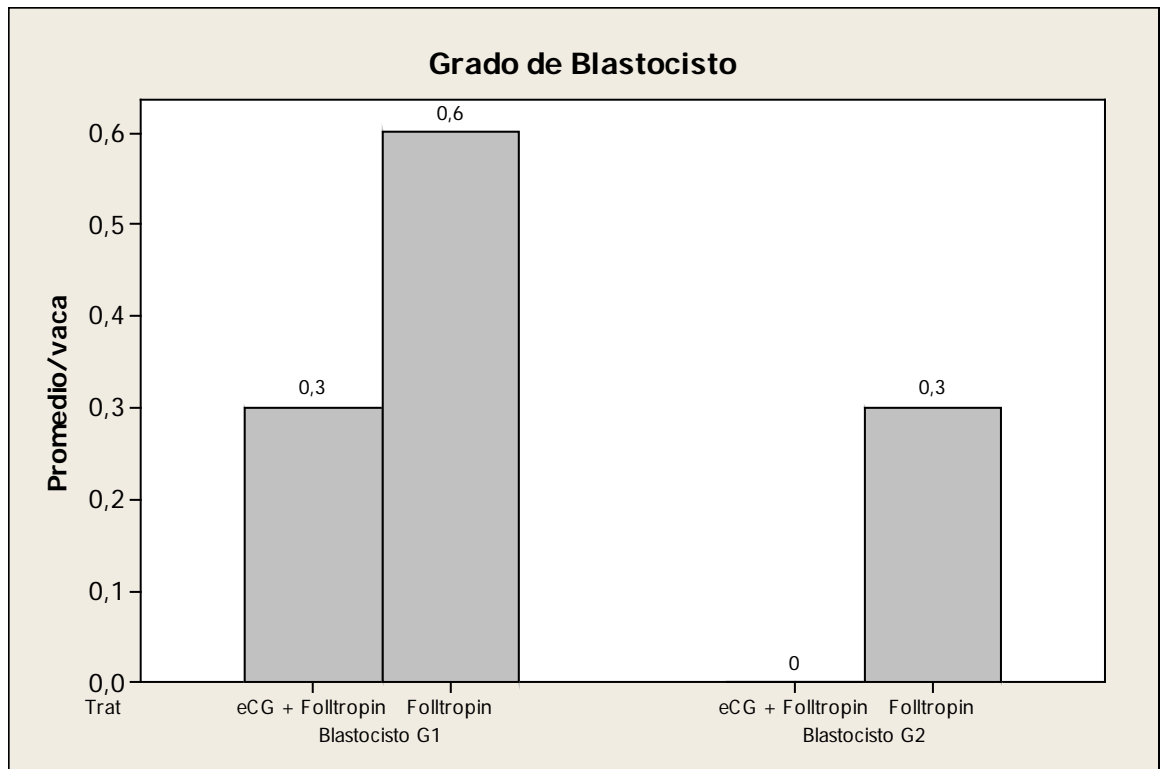


Gráfico 5. Representación en barras del grado de Blastocisto.

4.1.4.6. Prueba de Chi- cuadrado de las estructuras embrionarias viables.

Cuadro 23. Chi cuadrado de las estructuras embrionarias viables encontradas en la investigación.

Tratamientos	Transferibles	No transferibles	Total	Chi-cuad	P
eCG + Folltropin	19	3	22	0,006	0,93
Folltropin	27	4	31		
Total	46	7	53		

De acuerdo a la prueba de Chi cuadrado (0,006; $p > 0,05$) se establece que existió homogeneidad en la presencia de embriones transferibles y no transferibles entre los tratamientos empleados.

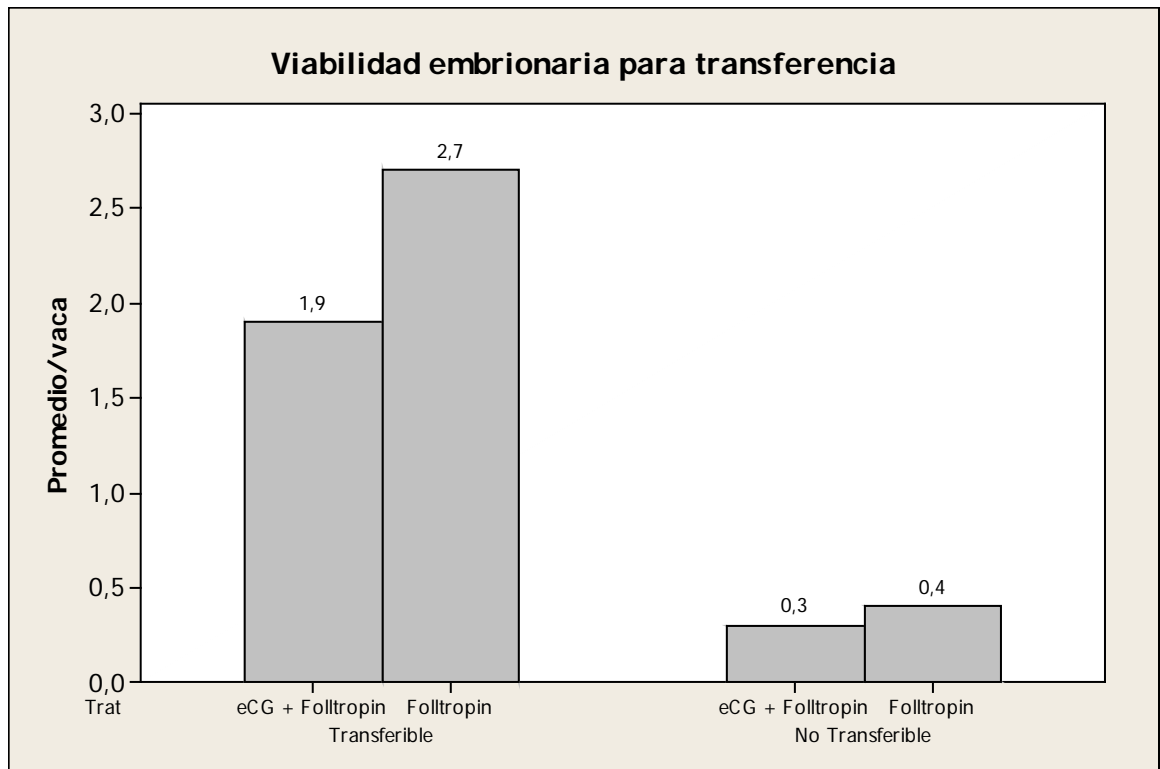


Gráfico 6. Representación en barras de los embriones transferibles y no transferibles.

4.1.4.7. Análisis de Varianza “ADEVA” del cuerpo lúteo, folículos anovulatorios y estructuras embrionarias.

Cuadro 24. Análisis de varianza de la presencia de cuerpos lúteos, folículos anovulatorios y estructuras encontradas.

		ANOVA				
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
# CL Ovario Derecho	Inter-grupos	6.050	1	6.050	1.788	.198
	Intra-grupos	60.900	18	3.383		
	Total	66.950	19			
# CL Ovario Izquierdo	Inter-grupos	1.250	1	1.250	.291	.596
	Intra-grupos	77.300	18	4.294		
	Total	78.550	19			
Cuerpos lúteos totales	Inter-grupos	12.800	1	12.800	1.440	.246
	Intra-grupos	160.000	18	8.889		
	Total	172.800	19			
Folículo Anovulatorio Ov. Derecho	Inter-grupos	4.050	1	4.050	6.231	.022
	Intra-grupos	11.700	18	.650		
	Total	15.750	19			
Folículo Anovulatorio Ov. Izquierdo	Inter-grupos	2.450	1	2.450	1.664	.213
	Intra-grupos	26.500	18	1.472		
	Total	28.950	19			
Folículos anovulatorios Totales	Inter-grupos	12.800	1	12.800	4.760	.043
	Intra-grupos	48.400	18	2.689		
	Total	61.200	19			
Total de Estructuras	Inter-grupos	4.050	1	4.050	.884	.360
	Intra-grupos	82.500	18	4.583		
	Total	86.550	19			

Según el análisis realizado se pone de manifiesto que no existe diferencias significativas entre los dos tratamientos empleados destinados a la superovulación de vacas donadoras de embriones con respecto al número de cuerpos lúteos desarrollados tanto en el ovario derecho como en el izquierdo ($p>0,05$), así mismo no se establece diferencias en los folículos anovulatorios del ovario izquierdo ($p>0,05$), de igual manera para el total de estructuras encontradas (ovocitos infertilizados, morulas y blastocistos) $p>0,05$. Sin embargo se estableció diferencias significativas en los folículos anovulatorios del ovario derecho y en el total de folículos

anovulatorios ($p < 0,05$) encontrándose 3 folículos no ovulados en el tratamiento eCG+ Folltropin y 12 folículos sin ovular en el tratamiento Folltropin, pudiendo pensar que al emplear la hormona FSH-p sola, los folículos emergentes del tratamiento para superovular no tienen el impulso suficiente para producir la ruptura de la teca folicular.

4.1.4.8. Análisis de varianza de las estructuras embrionarias encontradas.

Cuadro 25. Análisis de varianza de las estructuras embrionarias encontradas (Ovocitos fertilizados, Mórulas y Blastocistos)

ANOVA						
		Suma de cuadrados	gl	Media Cuadrática	F	Sig.
MORULAS	Inter-grupos	.200	1	.200	.083	.777
	Intra-grupos	43.600	18	2.422		
	Total	43.800	19			
BLASTOCISTOS	Inter-grupos	1.800	1	1.800	4.629	.045
	Intra-grupos	7.000	18	.389		
	Total	8.800	19			
Ovocitos Infertilizados	Inter-grupos	.050	1	.050	.360	.556
	Intra-grupos	2.500	18	.139		
	Total	2.550	19			

Al realizar el análisis se aprecia que no existe diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos sobre las mórulas y los ovocitos fertilizados ($p > 0,05$), sin embargo se puede apreciar diferencia significativa entre los tratamientos sobre los blastocistos ($p < 0,05$) generándose 3 blastocistos en el tratamiento eCG+Folltropin y 12 en el tratamiento Folltropin.

4.1.4.9. Análisis de varianza del estado de morulación de las estructuras embrionarias.

Cuadro 26. Análisis de varianza del grado de morulación de los embriones.

ANOVA						
		Suma de cuadrados	Gl	Media Cuadrática	F	Sig.
Mórula Grado 1	Inter-grupos	.050	1	.050	.030	.864
	Intra-grupos	29.700	18	1.650		
	Total	29.750	19			
Mórula Grado 2	Inter-grupos	.050	1	.050	.101	.754
	Intra-grupos	8.900	18	.494		
	Total	8.950	19			
Mórula Grado 3	Inter-grupos	.000	1	.000	.000	1.000
	Intra-grupos	3.200	18	.178		
	Total	3.200	19			

De acuerdo al ANOVA realizado se estable que no existen diferencias estadísticas significativas entre el grado de morulación entre los tratamientos empleados ($p > 0,05$).

4.1.4.10. Análisis de varianza del estado de Blastocisto de las estructuras embrionarias.

Cuadro 27. Análisis de varianza del grado de Blastocistos.

ANOVA						
		Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Blastocisto Grado 1	Inter-grupos	.450	1	.450	1.800	.196
	Intra-grupos	4.500	18	.250		
	Total	4.950	19			
Blastocisto Grado 2	Inter-grupos	.450	1	.450	3.857	.065
	Intra-grupos	2.100	18	.117		
	Total	2.550	19			

De acuerdo al ANOVA realizado se estable que no existen diferencias estadísticas entre el grado de blastocisto entre los tratamientos empleados ($p>0,05$).

4.1.4.11. Análisis de varianza de las estructuras embrionarias transferibles y no transferibles.

Cuadro 28. Análisis de varianza de las estructuras embrionarias transferibles y no transferibles.

ANOVA						
		Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Embriones Transferibles	Inter-grupos	3.200	1	3.200	.914	.352
	Intra-grupos	63.000	18	3.500		
	Total	66.200	19			
Embriones No Transferibles	Inter-grupos	.050	1	.050	.138	.714
	Intra-grupos	6.500	18	.361		
	Total	6.550	19			

De acuerdo al ANOVA realizado se estable que no existen diferencias estadísticas entre los tratamientos empleados ($p>0,05$) con respecto a la cantidad de embriones transferibles y no transferibles.

4.2. DISCUSIONES.

Al realizar el análisis estadísticos de las variables propuestas su estudio en esta investigación se obtuvo que la cantidad de cuerpos lúteos totales tuvo un promedio de $6,2 \pm 2,80$ para el grupo de vacas tratadas con eCG+ Folltropin siendo inferior a un $8,2 \pm 3,16$ cuerpos lúteos totales del grupo de vacas tratadas solo con Folltropin, no obstante no hubo diferencias estadísticas ($p > 0,05$). El número de cuerpos lúteos totales obtenidos en el tratamientos eCG+Folltropin son inferiores a los obtenidos por *Callejas et. al. 2005*, que obtuvieron $7,6 \pm 0,8$ cuerpos lúteos en promedio entre vacas y novillas (indiferenciadas) empleando en simultaneo $\frac{1}{2}$ dosis de eCG y $\frac{1}{2}$ dosis de FSH-p. No obstante son inferiores a los obtenidos por *Cifuentes et. al. 2009* con $13,7 \pm 0,9$ cuerpos lúteos empleando tres razas (europea, cebuina y europea/cebuina) y 200UI de eCG en conjunto con las dos últimas inyecciones de FSH-p.

En cuanto a los folículos anovulatorio (FA), en el tratamiento con eCG se obtuvo un promedio $1 \pm 1,33$ folículos que no pudieron ovular y al contrastar con los FA obtenidos en el tratamiento sin esta hormona en un promedio de $1,8 \pm 1,79$ se obtuvo una diferencia estadística significativa al 5% ($p < 0,05$), probablemente, según *Munar et. al. 2008*, este resultado se deba a que no existe el estímulo suficiente de LH en el tratamiento con Folltropin que hace que los folículos no ovulen en el momento oportuno.

Las estructuras totales de $2,2 \pm 2,33$ obtenidas en el tratamiento con eCG frente a las obtenidas en el tratamiento sin eCG de $3,1 \pm 1,96$, se establecen como estadísticamente similares ($p > 0,05$). Siendo inferior a los obtenidos por *Cifuentes et. al. 2009*, tanto en el tratamiento eCG + Folltropin como en el Folltropin solo. Sin embargo *Callejas et. al. 2005* obtiene $6,3 \pm 0,7$ estructuras recuperados pos-colecta lo que hace pensar que probablemente no se realizó un eficiente proceso de colecta de los

embriones ya que al contrastar con el número de cuerpos lúteos obtenidas, este es totalmente superior.

De acuerdo a los embriones transferibles obtenidos es esta investigación, podemos apreciar que se obtuvo un promedio de $1,9 \pm 1,97$ embriones transferibles obtenidos en el tratamiento con eCG+Folltropin frente a $2,7 \pm 1,78$ embriones transferibles obtenidos en el tratamiento Folltropin solo, siendo inferior a lo obtenido por *Cifuentes et. al 2009* en los dos tratamientos, quienes obtuvieron $8,9 \pm 1$ embriones transferibles en el tratamiento con eCG, y $4,6 \pm 0,6$ embriones transferibles en el tratamiento sin eCG.

Estos resultados difieren con los obtenidos por Cifuentes E., Quevedo L., Hoyos A., Carballo D., Piccardi M., Bó G.A. 2009. Quienes encontraron resultados positivos en vacas de ganado de carne utilizando el “eCG en vacas donantes de embriones superovuladas con Folltropin-V” dando como conclusión que hay una diferencia significativa en la cantidad de Ovocitos/Embriones totales colectados, ovocitos fertilizados y embriones transferibles.

Hay que considerar que tanto la destreza del operador del ecógrafo como de la persona que colecta los embriones, influye drásticamente en los resultados obtenidos ya que al haber diferencias significativas ($t_{0,05} = 5,75$; $p = 0,000 < 0,05$) entre el número de cuerpos lúteos observados y el número de estructuras embrionales totales colectadas (ovocitos no fertilizados, mórulas y blastocistos) se estaría generando sesgo estadístico causado por el factor humano, alterando significativamente los resultados.

V CONCLUSIONES

- Del estudio desarrollado se concluye que se rechaza la hipótesis planteada, y se acepta la hipótesis nula en la que se define que la media del primer caso (Tratamiento eCG más FSH-p) es igual a la media del segundo caso (Tratamiento sin eCG más FSH-p).
- El uso de eCG adicionado a la FSH-p no mejora el número de folículos ovulatorios así como la frecuencia de estructuras lúteas en los ovarios (derecho e izquierdo).
- De igual forma no hay diferencia significativa entre las estructuras embrionarias encontradas así como tampoco en el grado de calidad (grado de mórula y grado de blastocisto).
- No hay diferencia estadística entre los tratamientos con respecto a la cantidad de embriones transferibles.
- El uso de eCG en los últimos días de la superovulación con Foltropin-V (FSH-p) no mejoró el número total de embriones colectados, ovocitos fertilizados y número de embriones fértiles.



VI RECOMENDACIONES

- Como alternativa muy interesante para aumentar la respuesta superovulatoria y la buena calidad de embriones obtenidos por tratamiento, es necesario continuar con la realización de los tratamientos superovulatorios con eCG combinado con FSH-p y favorecen el crecimiento final de los folículos reclutados por los pulsos de LH.
- Continuar las investigaciones en la combinación de hormonas utilizadas en los protocolos de superovulación, con la finalidad de mejorar el número de estructuras de embriones viables y transferibles.
- Realizar otras investigaciones que permitan evaluar diferentes compuestos hormonales para buscar una nueva forma de mejorar los índices reproductivos, especialmente en hembras bovinas de raza holstein friesland sometidas a este tipo de programas reproductivos.



VII BIBLIOGRAFÍA

ASSOCIATION EUROPEAN OF EMBRYO TRANSFER, 2000.

Proceedins of the Scientifics Meetings of the. Retrieved from
www.aete.eu: http://www.aete.eu/pdf_publication/19.pdf

AVILA G, 2009. Transferencia de embriones. Memoria del curso teórico práctico sobre Trasnserncia de Embriones en ganado bovino. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. Mexico DF. Pág. 19 - 31. Consulta: 04 - 01 - 2013.

BARCELÓ M, 2010. Manual para Transferencia de Embriones en Ovinos. México: Publicación de la Facultad Zootecnia y chihuahua-Mexico. Pág. 12 - 32. Consulta: 05 - 03 -2013.

BARROS, C. et al,. 2005. Superovulation and embryo transfer in Bos indicus cattle. Retrieved from Theriogenology. Pág. 9.

BARROS, C. et al,. 2008. Im-provement of a superovulatory protocol in nelore cows: replacing the last two doses of pFSH by eCG. Retrieved from Reprod. Fertil. Dev. Pág. 12. Consulta: 12 - 02 - 2013.

BARUSELLI, S. 2004. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. Retrieved from Anim Reprod Sci.Pág. 10 - 20. Consulta: 13 - 02 -2013.

BARUSELLI, S. et al,. 2010. AVANCES DE PROTOCOLOS DE SUPEROVULACIÓN EN BOVINOS. Memorias del XII Curso internacional de Reproducción Bovina. FMVZ-UNAM. Mexico DF. Consulta: 15 - 01 -2013.

BETTERIDGE, K. 2003. Una historia de la transferencia de embriones de animales de granja y algunas técnicas asociadas. Retrieved 01 2013, from Animal Reproduction Science: <http://www.journals.elsevierhealth.com>. Pág. 203 - 244. Consulta: 01 - 10 -2012.

- BO, G., et al. 2005.** Application of fixed-time artificial insemination and embryo transfer programs in beef cattle operations. In: Proc Joint Mtg Am Embryo Trans Assoc & Can Embryo Trans Assoc. Retrieved from Minneapolis MN. Pág. 10 - 19. Consulta: 18 - 02 - 2013.
- BOUSQUET D., 1999.** In vitro de embriones de producción en la vaca: una eficaz alternativa a la convencional embrión producción enfoque . Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>. Pág. 59 - 70. Consulta: 05 - 02 -2013.
- BRUCE M., 1991.** Equine Chorionic Gonadotropin. Retrieved from The Endocrine Society: <http://edrv.endojournals.org/content/12/1/27.short>. Pág. 12 Consulta: 10 - 11 -2012.
- GIBSON J., 1989.** The incorporation of biotechnologies into animal breeding strategies. (Vol. first Ed). (B. LA, Ed.) New York: Comprehensive Biotechnology. Pág. 24 - 29. Consulta: 13 - 01 - 2013.
- CALLEJAS., 1995.** Fisiología del ciclo estral bovino. (U. y. S.A, Ed.) Retrieved from Jornadas de Biotecnología de la Reproducción en hembras de interés zootécnico. Pág. 15. Consulta: 11 - 11 -2012.
- CETA., 2006.** www.ceta.ca. Retrieved 1 2013, from <http://www.ceta.ca/pdfs/ETstats2006.pdf> Consulta: 08 - 01 -2013.
- DE LA FUENTE JA., 1992.** Transferencia de Embriones en Ganado Vacuno. Bovinotecnia n° 7. Pág. 145 - 159. Consulta: 23 - 02 - 2013.
- FUENTES S., 2005.** Utilización de tratamientos hormonales para la sincronización de receptoras de embriones. Producción Animal n° 160. Pág 26 - 30. Consulta: 08 - 01 -2013. Consulta: 11 - 01 -2013.
- SEIDEL G., 2010.** Breve introducción a todo - genoma de selección en ganado utilizando un solo nucleótido polimorfismo . Retrieved 1 2013, from Reprod Fertil Dev: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Brief%20introduction%20to%20whole%20genome%20selection%20in%20cattle%20%20using%20single%20nucleotide%20polymorphisms>. Consulta: 03-01-2013.

- GORFREY B. 1991.** Reproducción Animal. Diagnóstico y Técnicas Terapéuticas (2° ed ed.). México DF, Mexico: Limusa. Pág. 1969 - 1977. Consulta: 07 - 11 -2012.
- GORLACH A. 1997.** Transferencia de Embriones en el ganado vacuno. (S. A. Blanco., Trans.) Zaragoza-España, España.: Acribia S.A. Pág. 9 - 33. Consulta: 08 - 01 -2013.
- HINCAPIE J., 2005.** Reproducción Animal Aplicada: Fundamentos de Fisiología y Biotecnología. Tegucigalpa: Litocom. Pág. 22 - 46. Consulta: 12 - 03 -2012.
- IETS. 2007.** Data Retrieval Committee statistics of Embryo Transfer- Year 2006. Retrieved 2012, from <http://www.iets.org/pdf/December2007.pdf>. Consulta: 03-10-2012.
- BETTERIDGE K., 2007.** An historical look at embryo transfer. Retrieved from J Reprod Fertil. Pág. 19. Consulta: 03-02-2013.
- LAMMOGLIA M., 2010.** Nuevos protocolos de superovulación y sincronización de programas de transferencia de embriones en bovinos. Curso internacional de reproducción Bovina. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Nacional Autónoma de Mexico. Mexico DF. Consulta: 22-11-2012.
- LAMP C., 2009.** Determinación de parámetros reproductivos utilizando transferencia de embriones en cinco explotaciones bovinas de la serranía ecuatoriana. Pág. 10 - 42. Consulta: 21 - 12 -2012.
- LUCY M., 2007.** The bovine dominant ovarian follicle. Retrieved from Journal of Animal Science. Pág. 89 - 99. Consulta: 10 - 12 -2012.
- MANOEL, SÁ FILHO., 2009.** AVANÇOS NOS PROTOCOLOS DE SUPEROVULAÇÃO DE BOVINOS. Retrieved from Departamento de Reprodução Animal, FMVZ-USP. Consulta: 08-04-2013.
- MAPLEFOFT, et al., 2009.** Nuevos tratamientos Hormonales para la superovulación de donantes de embriones bovinos. 8° Simposio Internacional de Reproducción Animal, organizado por el IRAC. Córdoba, Argentina. Consulta: 18 -08-2012.
- MAPLETOF, R., 2002.** Capacidade ovulatoria em novilhas Bos indicus. Retrieved from Acta. Sci. Vet. Consulta 15 - 09 - 2012.



- MAPLETOFT, R., 2005.** Assisted reproductive technologies in cattle: a review. Retrieved from Rev Sci Tech: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16110904>. Pág. 393 - 403. Consulta: 13 - 11 -2012.
- MASSIMILIANO E., 2009.** Manual de Reproducción en ganado vacuno. Servet. Pág. 4 - 59. Consulta: 03 - 10 -2012.
- MATTOS M., 2010.** Uso de la gonadotropina coriónica equina después de la transferencia de embriones en vacas Nelore y cruza receptoras. Sao Pablo - Brasil: Universidad Estadual Paulista. Pág. 49. Consulta: 20 - 12 -2012.
- MOSQUERA J., 1994.** Transferencia de embriones para la optimización reproductiva de la cría lechera. Retrieved from Trabajos seleccionados sobre producción lechera en la sierra Ecuatoriana; Proyecto Andino de sanidad agropecuaria. Oficina del IICA (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura) Ecuador. Pág. 49. Consulta: 09 - 12 -2012.
- PALMA G., 2001.** Biotecnología de la Reproducción. (Primera edición ed.). Argentina: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Pág. 125 - 135. Consulta: 18 - 12 -2012.
- PURLEY J., 1995.** Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2a and GnRH. Retrieved from Theriogenology. Pág. 12. Consulta: 13 - 11 -2012.
- RIPPE C., 2009.** El Ciclo Estral del Bovino. Retrieved from Miniapolis. Dairy Cattle Reproduccion. Pág. 6 - 12. Consulta: 08 - 01 -2013.
- SÁ FILHO, ET AL., 2010.** AVANÇOS NOS PROTOCOLOS DE SUPEROVULAÇÃO DE BOVINOS. Memorias del XII Curso International e Reproducción Bovina. FMVZ-UNAM. Pág. 19-22. Consulta: 08 - 01 -2013.
- SEIDEL G., 1981.** Superovulation and embryo transfer in cattle. Retrieved enero 2013, from Science New Series,: <http://www.jstor.org/discover/10.2307/1685333?uid=3737912&uid=2&uid=4&sid=21101578343521>. Pág. 351 - 358. Consulta: 08 - 01 - 2013.
- SEIDEL G., 1991.** Manual de capacitación para la transferencia de embriones en bovinos. Retrieved 1 2013, from Laboratorio de



Reproducción

Animal:

<http://www.fao.org/docrep/004/T0117E/T0117E00.HTM#pre>.

Consulta: 13 - 12 -2012.

SIDEL G., 1986. Procedimientos para Recolección, División, Congelación y Transferencia de Embriones en Bovinos,. (T. p. D.V.M, Ed.) Fort Collins, Colorado, Colorado: Boletin No. 2 Laboratorio de Reproducción Animal Colorado StateUniversity. Consulta: 04-02-2013.

SMITH C., 1988. Aplicaciones de la transferencia de embriones en la cría de animales. Retrieved 01 2013, from Theriogenology: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X88900404>. Consulta 04-01-2013.

TEEPKER., 1989. SELECCIÓN DE TOROS ORIGINARIOS DE UNA UNIDAD DE CRÍA NÚCLEO PARA SU USO EN UNA POBLACIÓN lecheros. Retrieved 1 2013, from Canadian Journal of Animal Science: <http://pubs.aic.ca/doi/abs/10.4141/cjas89-071>. Consulta 04-01-2013.

THIBIER M., 2003. Un informe de la Recuperación de la IETS Data Committee- Por el Profesor Michel Thibier. Retrieved from MÁS DE MEDIO MILLÓN DE EMBRIONES BOVINOS trasladen EN 2002. IETS Newsletter: <http://www.iets.org/pdf/december2003.pdf>. Pág. 12 - 19. Consulta: 06 - 12 -2012.

VALENCIA M., 2009. Criopreservación de embriones en Bovinos. Memorias del curso teórico-práctico sobre Transferencia de Embriones en ganado bovino.Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Universidad Autónoma de México. México DF . Consulta: 13 - 12 -2012.

VELEZ M., 2006. Producción de Ganado Lechero en el Trópico. Honduras: Zamorano Academic Press. Pág 324 - 326. Consulta: 12 -11 -2012.

VÉLEZ M., 2002. Producción de ganado lechero en el Trópico (4ta. ed. ed.). Tegucigalpa, Honduras: Ed. Zamorano Academic Press. 318 - 321. Consulta: 12 - 11 -2012.



ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de Superovulación con eCG en vacas Donadoras (eCG más Folltropin) utilizado para donadoras.

- Vaca No. 490 Nombre: Pinta
- Vaca No. 483 Nombre: Ambateña
- Vaca No. 401 Nombre: Lupe
- Vaca No. 518 Nombre: Estefanía.

DIA	HORA	TRATAMIENTO		OBSERVACIONES
Jueves, 20-Dic-2012	9:00 AM	Dispositivo liberador P4 CIDR + 100mg de P4 + BE 3 mg.		CIDR Intravaginal; 4 ml Gestavec IM; 0.5 ml Grafoleon IM
Lunes, 24-Dic-2012	6:00 AM	Folltropin 3 ml		
	6:00 PM	Folltropin 3 ml		
Martes, 25-Dic-2012	6:00 AM	Folltropin 2,5 ml		
	6:00 PM	Folltropin 2,5 ml		
Miérc, 26 - Dic-2012	6:00 AM	Folltropin 2 ml	Estrumate 2ml	
	6:00 PM	Folltropin 2 ml	Estrumate 2ml	
Jueves, 27 - Dic - 2012	6:00 AM	Folltropin 1.5 ml	Folligon 1 ml	Retiro del implante CIDR
	6:00 PM	Folltropin 1.5 ml	Folligon 1 ml	
Viernes, 28-Dic-2012	6:00 AM	Fertagyl 5ml		
	6:00 PM	Inseminación Artificial		
Sábado, 29-Dic-2012	6:00 AM	Inseminación Artificial		
	6:00 PM	Inseminación Artificial		
Viernes, 4-Ene-2013	9:00 AM	Colecta de Embriones		

Anexo 2. Protocolo eCG más Folltropin utilizado para donadoras

- Vaca No. 487 Nombre: Jaiden.
- Vaca No. 712 Nombre: Jota.
- Vaca No. 495 Nombre: Roció.
- Vaca No. 528 Nombre: Mona.

DIA	HORA	TRATAMIENTO		OBSERVACIONES
Miérc, 23- Ene-2013	9:00 AM	Dispositivo liberador P4 CIDR + 100mg de P4 + BE 3 mg.		CIDR Intravaginal, 4 ml Gestavec IM, 0.5 ml Grafoleon IM
Dom, 27- Ene-2013	6:00 AM	Folltropin 3 ml		
	6:00 PM	Folltropin 3 ml		
Lunes, 28- Enero-2013	6:00 AM	Folltropin 2,5 ml		
	6:00 PM	Folltropin 2,5 ml		
Martes, 29 - Ene-2013	6:00 AM	Folltropin 2 ml	Estrumate 2ml	
	6:00 PM	Folltropin 2 ml	Estrumate 2ml	
Miércoles, 30 - Enero – 2013	6:00 AM	Folltropin 1,5 ml	Folligon 1 ml	Retiro del implante CIDR
	6:00 PM	Folltropin 1,5 ml	Folligon 1 ml	
Jueves, 31- Ene-2013	6:00 AM	Fertagyl 5ml		
	6:00 PM	Inseminación Artificial		
Viernes, 1- Feb-2013	6:00 AM	Inseminación Artificial		
	6:00 PM	Inseminación Artificial		
Jueves, 7- Feb-2013	9:00 AM	Colecta de Embriones		

Anexo 3. Protocolo eCG más Folltropin (FSH-p) utilizado para donadoras.

- Vaca No. 1078 Nombre: Gema.
- Vaca No. 262 Nombre: María.

DIA	HORA	TRATAMIENTO		OBSERVACIONES
Lunes, 4-Feb-2013	9:00 AM	Dispositivo liberador P4 CIDR + 100mg de P4 + BE 3 mg.		CIDR Intravaginal, 4 ml Gestavec IM, 0.5 ml Grafoleon IM
Viernes, 8-Feb-2013	6:00 AM	Folltropin 3 ml		
	6:00 PM	Folltropin 3 ml		
Sáb, 9-Feb-2013	6:00 AM	Folltropin 2,5 ml		
	6:00 PM	Folltropin 2,5 ml		
Dom, 10-Feb-2013	6:00 AM	Folltropin 2 ml	Estrumate 2ml	
	6:00 PM	Folltropin 2 ml	Estrumate 2ml	
Lunes, 11 - Feb – 2013	6:00 AM	Folltropin 1,5 ml	Folligon 1 ml	Retiro del implante CIDR
	6:00 PM	Folltropin 1,5 ml	Folligon 1 ml	
Martes, 12-Feb-2013	6:00 AM	Fertagyl 5ml		
	6:00 PM	Inseminación Artificial		
Miérc, 13-Feb-2013	6:00 AM	Inseminación Artificial		
	6:00 PM	Inseminación Artificial		
Martes, 19-Feb-2013	9:00 AM	Colecta de Embriones		

Anexo 4. Evaluación y clasificación de los embriones obtenidos mediante el protocolo de superovulación con eCG más FSH-p.

Vaca No.	OVARIO DERECHO		OVARIO IZQUIERDO		ESTRUCTURAS COLECTADAS SEGÚN LAIETS				TOTAL DE EMBRIONES	
	CUERPO LUTEO	FOLICULO ANOVULATORIO	CUERPO LUTEO	FOLICULO ANOVULATORIO	Número de Estructuras	UFOS	MORULA	Blastocisto Temprano	Transferible	No transferible
490	3	0	3	3	0				0	0
483	8	0	5	2	1		1 (4.2)		1	
401	0	0	3	0	0				0	0
518	5		3		3		2 (4.1)	1 (6.1)	3	0
487	2	0	5	0	4		2 (4.1) y 2 (4.2)		4	0
712	5	1	3	1	7	1	4 (4.1) y 1 (4.3)	1 (6.1)	5	2
495	3	2	2	1	2		1 (4.1)	1 (6.1)	2	0
528	2		3		0				0	0
1078	4	0	3	0	4		3 (4.1) y 1(4.2)		4	0
262	3	0	1		1		1 (4.3)		0	1

(4.1)= Mórula calidad excelente.

(4.2)= Mórula calidad bueno.

(4.3)= Mórula calidad regular.

(6.1)= Blastocisto temprano calidad excelente.

Anexo 5. Protocolo de superovulación en vacas control sin eCG en vacas Donadoras (Sin eCG, con Folltropin-V) utilizado para donadoras.

- Vaca No. 542 Nombre: Martha
- Vaca No. 734 Nombre: Lucia
- Vaca No. 237 Nombre: Nacha
- Vaca No. 622 Nombre: Luz

DIA	HORA	TRATAMIENTO		OBSERVACIONES
Jueves, 21-Feb-2013	9:00 AM	Dispositivo liberador P4 CIDR + 100mg de P4 + BE 3 mg.		CIDR Intravaginal; 4 ml Gestavec IM; 0.5 ml Grafoleon IM
Lunes, 25-Feb-2013	6:00 AM	Folltropin 3 ml		
	6:00 PM	Folltropin 3 ml		
Martes, 26-Feb-2013	6:00 AM	Folltropin 2,5 ml		
	6:00 PM	Folltropin 2,5 ml		
Miérc, 27 - Feb-2013	6:00 AM	Folltropin 2 ml	Estrumate 2ml	
	6:00 PM	Folltropin 2 ml	Estrumate 2ml	
Jueves, 28 - Feb – 2013	6:00 AM	Folltropin 1.5 ml		Retiro del implante CIDR
	6:00 PM	Folltropin 1.5 ml		
Viernes, 1-Marzo-2013	6:00 AM	Fertagyl 5ml		
	6:00 PM	Inseminación Artificial		
Sábado, 2-Marzo-2013	6:00 AM	Inseminación Artificial		
	6:00 PM	Inseminación Artificial		
Viernes, 8-Ene-2013	9:00 AM	Colecta de Embriones		

Anexo 6. Protocolo sin eCG, con Folltropin-V (FSH liofilizada) utilizado para donadoras.

- Vaca No.161 Nombre: Negra
- Vaca No.324 Nombre: Noemí
- Vaca No.482 Nombre: Mary
- Vaca No.115 Nombre: Dora

DIA	HORA	TRATAMIENTO		OBSERVACIONES
Miércoles,6-Marzo-2013	9:00 AM	Dispositivo liberador P4 CIDR + 100mg de P4 + BE 3 mg.		CIDR Intravaginal, 4 ml Gestavec IM, 0.5 ml Grafoleon IM
Dom, 10-Marzo-2013	6:00 AM	Folltropin 3 ml		
	6:00 PM	Folltropin 3 ml		
Lunes, 11-Marzo-2013	6:00 AM	Folltropin 2,5 ml		
	6:00 PM	Folltropin 2,5 ml		
Martes, 12 - Marzo-2013	6:00 AM	Folltropin 2 ml	Estrumate 2ml	
	6:00 PM	Folltropin 2 ml	Estrumate 2ml	
Miércoles, 13 - Marzo – 2013	6:00 AM	Folltropin 1,5 ml		Retiro del implante CIDR
	6:00 PM	Folltropin 1,5 ml		
Jueves, 14-Marzo-2013	6:00 AM	Fertagyl 5ml		
	6:00 PM	Inseminación Artificial		
Viernes, 15-Marzo-2013	6:00 AM	Inseminación Artificial		
	6:00 PM	Inseminación Artificial		
Jueves, 21-Marzo-2013	9:00 AM	Colecta de Embriones		

Anexo 7. Grupo 3; Protocolo sin eCG, con Folltropin-V (FSH liofilizada) utilizado para donadoras.

- Vaca No. 259 Nombre: Luna.
- Vaca No. 173 Nombre: Lorena.

DIA	HORA	TRATAMIENTO		OBSERVACIONES
Lunes, 18-Marzo-2013	9:00 AM	Dispositivo liberador P4 CIDR + 100mg de P4 + BE 3 mg.		CIDR Intravaginal, 4 ml Gestavec IM, 0.5 ml Grafoleon IM
Viernes, 22-Marzo-2013	6:00 AM	Folltropin 3 ml		
	6:00 PM	Folltropin 3 ml		
Sáb, 23-Marzo-2013	6:00 AM	Folltropin 2,5 ml		
	6:00 PM	Folltropin 2,5 ml		
Dom, 24-Marzo-2013	6:00 AM	Folltropin 2 ml	Estrumate 2ml	
	6:00 PM	Folltropin 2 ml	Estrumate 2ml	
Lunes, 25-Marzo- 2013	6:00 AM	Folltropin 1,5 ml		Retiro del implante CIDR
	6:00 PM	Folltropin 1,5 ml		
Martes, 26-Marzo-2013	6:00 AM	Fertagyl 5ml		
	6:00 PM	Inseminación Artificial		
Miérc, 27-Marzo-2013	6:00 AM	Inseminación Artificial		
	6:00 PM	Inseminación Artificial		
Martes, 2-Abril-2013	9:00 AM	Colecta de Embriones		

Anexo 8. Evaluación y clasificación de los embriones obtenidos mediante el protocolo de superovulación sin eCG más FSH-p. (Grupo Control)

Vaca No.	OVARIO DERECHO		OVARIO IZQUIERDO		ESTRUCTURAS COLECTADAS SEGÚN LA IETS				TOTAL DE EMBRIONES	
	CUERPO LÚTEO	FOLICULO ANOVULATORIO	CUERPO LÚTEO	FOLICULO ANOVULATORIO	Total de estructuras	UFOS	MORULA	Blastocisto Temprano	Transferible	No transferible
542	4	0	5	1	4	0	2 (4.1) y 1 (4.2)	1 (6.2)	4	0
734	6	2	3	1	4	0	2 (4.1) y 1 (4.3)	1 (6.1)	3	1
237	3	2	2	1	0	0	0	0	0	0
622	6	0	8	2	6	1	3(4.1)	1(6.1) 1(6.2)	5	1
161	4	1	3	0	3	0	1 (4.1) y 1 (4.3)	1(6.1)	2	1
324	5	3	7	4	5	0	2 (4.1) y 1 (4.2)	1(6.1) 1(6.2)	5	0
482	3	1	5	2	4	1	2 (4.2)	1(6.1)	3	1
115	3	1	0	0	2	0	2 (4.1)	0	2	0
259	7	1	0	3	0	0	0	0	0	0
173	5	1	3	0	3	0	1(4.1) 1(4.2)	1(6.1)	3	0

(4.1)= Mórula calidad excelente.

(4.2)= Mórula calidad bueno.

(4.3)= Mórula calidad regular.

(6.1)= Blastocisto temprano calidad excelente.

(6.2)= Blastocisto temprano calidad bueno.

ANEXO 9. PRESUPUESTO

Materiales usados	Unidad	Cantidad	Precio unitario	Precio Total
CIDR	Und	10	14.60	146.00
Pistola Implantadora	Und	1	5.00	5.00
Grafoleon x 20cc	Und	2	7.80	15.60
Gonaxal x 50cc	Und	2	75.00	150.00
Foltropin –V(FSH – p)	Und	10	200.00	2000.00
Folligon (eCG)	Und	5	12,4.00	62.00
Sonda Foley	Und	10	45.00	450.00
Sonda de doble vía	Und	10	45.00	450.00
PBS	Und	3	45.00	145.00
Holding		3	45.00	145.00
Etilenglicol		3	45,00	145.00
Filtro colecta embriones	Und	10	45	450
Jeringuillas	Und	100	0,15	15
Agujas	Und	100	0,07	7
Materiales de oficina	Und			300
TOTAL				4485,60

ANEXO 10. FOTOGRAFIAS:



VACAS DONADORAS



VACA DONADORA



PREPARACIÓN DEL ECÓGRAFO



REALIZANDO LA ECOGRAFÍA



OBSERVACIÓN DE CUERPOS LUTEOS



OBSERVACIÓN DE CUERPOS LUTEOS



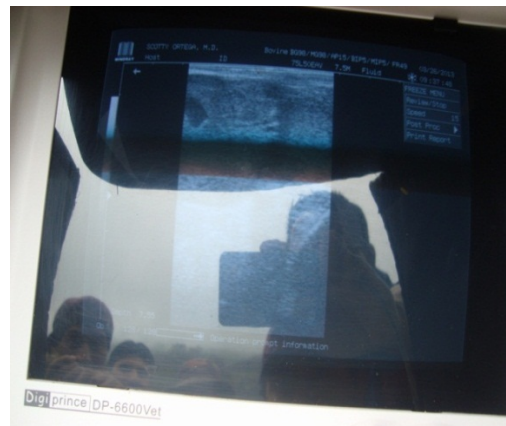
FOLÍCULOS ANOVULATORIOS



OBSERVACIÓN DE CUERPO LÚTEO



OBSERVACIÓN DE CUERPOS LUTEOS ANOVULATORIOS



OBSERVACIÓN DE FOLÍCULOS



OBSERVACIÓN DE FOLÍCULOS Y CUERPOS LÚTEOS



ANESTESIA EPIDURAL



APLICACIÓN DE ANESTESIA EPIDURAL



REALIZANDO LA ASEPSIA



INTRODUCCION DEL CATÉTER CON LA Sonda FOLEY



INTRODUCCIÓN DE LA Sonda FOLEY



PREPARACIÓN DE MATERIAL PARA EL LAVADO



PREPARACIÓN DE LABORATORIO



ESTEREOMICROSCOPIO



**FILTRO CON EMBRIONES COLECTADOS
COLECTADAS**

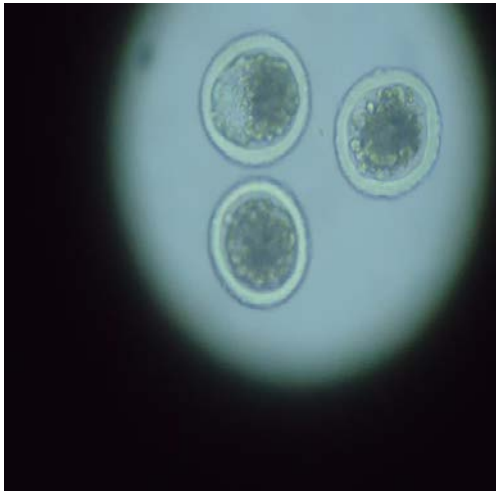


OBSERVACIÓN DE ESTRUCTURAS



**OBSERVACIÓN DE ESTRUCTURAS COLECTADAS OBSERVACIÓN DE MÓRULAS Y
BLASTOCISTOS**





**OBSERVACIÓN DE ESTRUCTURAS COLECTADAS OBSERVACIÓN DE MÓRULAS Y
BLASTOCISTOS.**

GLOSARIO.

Blastocisto. Es un embrión de 6/8 días de desarrollo que presenta una estructura celular compleja formada por aproximadamente 200 células. La fase de blastocisto es el estadio de desarrollo previo a la implantación del embrión en el útero materno.

Blastómeros. Son un tipo de células embrionarias animales indiferenciadas resultantes de la segmentación del cigoto después de la fecundación. Estas células poseen pluripotencialidad, o sea que pueden dar origen a células de cualquier tejido excepto los que rodean al embrión.

Congelación. Es una forma de conservación que se basa en la solidificación del agua contenida en éstos. Por ello uno de los factores a tener en cuenta en el proceso de congelación es el contenido de agua del producto. En función de la cantidad de agua se tiene el calor latente de congelación.

Criopreservación. Es el proceso en el cual células o tejidos son congelados a muy bajas temperaturas, generalmente entre -80 °C y -196 °C (el punto de ebullición del nitrógeno líquido) para disminuir las funciones vitales de una célula o un organismo y poderlo mantener en condiciones de vida suspendida por mucho tiempo.

Donantes. Son aquellas vacas destinadas en un programa de superovulación y transferencia de embriones en bovinos con la finalidad de ser colectados sus embriones para ser transferidos a una hembra receptora que gesta y pare a los productos.

Embrión. Es la etapa inicial del desarrollo de un ser vivo mientras se encuentra en el huevo o en el útero de la madre.



Estimulación. Es la actividad que se le otorga a los seres vivos para un buen desarrollo o funcionamiento, ya sea por cuestión laboral, afectiva o física.

Estrógeno. Son hormonas sexuales esteroideas (derivadas del ciclopentanoperhidrofenantreno) de tipo femenino principalmente, producidos por los ovarios, la placenta durante el embarazo y, en menores cantidades, por las glándulas adrenales.

Folículos. Son las unidades básicas de la biología reproductiva femenina. Consisten en una célula gamética, rodeada de células diploides denominadas células de la granulosa, y por fuera de estas están las células de la teca. Los folículos se encuentran en el interior del ovario.

Genética. Es el campo de la biología que busca comprender la herencia biológica que se transmite de generación en generación.

Gonadotrofinas. Las gonadotropinas o gonadotrofinas son una serie de hormonas secretadas por la hipófisis (glándula pituitaria), gracias a la hormona liberadora de gonadotropinas (Gn-RH), y están implicadas en la regulación de la reproducción en los vertebrados. Hay tres gonadotropinas: la hormona luteinizante (LH), la hormona estimulante del folículo (FSH) y la gonadotropina coriónica humana (abreviada GCH o HCG).

Hormonas. Son sustancias secretadas por células especializadas, localizadas en glándulas de secreción interna o glándulas endocrinas (carentes de conductos), o también por células epiteliales e intersticiales cuyo fin es la de afectar la función de otras células.

Laparatomía. Es una cirugía que se hace con el propósito de abrir, explorar y examinar para tratar los problemas que se presenten en el abdomen. Existen dos tipos de laparotomía, la simple y la exploratoria.

Luteólisis. Es la regresión del cuerpo lúteo.

Mórula. Es una masa de células que se da después de las blastómeras; es producida mediante la hendidura embrionaria, etapa que consiste en subsecuentes divisiones del cigoto en células más pequeñas, pero de tamaño uniforme, división sin crecimiento. Habiendo alcanzado el estado de 16 células, éstas se empiezan a diferenciar.

Ovulación. Es uno de los procesos del ciclo estral en el cual el folículo ovárico se rompe y libera el óvulo.

Óvulo. Son las células sexuales o gametos femeninos.

Progesterona. También conocida como P4, es una hormona esteroide involucrada en el ciclo estral, preñez (promueve la gestación) y embriogénesis de los humanos, animales y otras especies.

Superovulación. Son tratamientos que se realiza en vacas con el fin de producir gran número de ovulaciones y obtener el máximo número de embriones transferibles que resulten en una alta probabilidad de preñez.

Transferencia. La transferencia de embriones es una técnica por la cual los embriones son colectados de una hembra donante y transferidos a una hembra receptora que gesta y pare los productos.